

Untersuchungen zur orts aufgelösten Zinkverteilung in Mammakarzinomen und der Korrelation zum Tumortyp und zu histologischen Prognosefaktoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

David Riesop

geboren in Hattingen

Institut für Umweltanalytik

der

Universität Duisburg-Essen

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2009 bis Juli 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hirner am Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 23.10.2013

Gutachter:	Prof. Dr. Hirner
	Prof. Dr. Bankfalvi
Vorsitzender:	PD Dr. Telgheder

Für meine Frau Tadi und meine Kinder Claas und Hanna.

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	7
2.	<i>Theoretische Grundlagen</i>	10
	2.1 Zink und das Mammakarzinom	10
	2.1.1 Brustkrebs	10
	2.1.2 Progenitorzellkonzept des Mammaepithels	11
	2.1.3 Die Subtypen des Mammakarzinoms	12
	2.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren	15
	2.1.5 Zink und die Karzinogenese	19
	2.1.6 Elementspezifische Untersuchungen an Mammakarzinomen	20
	2.2 Ortsaufgelöste Elementanalytik in biologischen Proben	22
	2.2.1 LA-ICP-MS zur ortsaufgelösten Elementanalytik	25
	2.2.2 Der Ablationsprozess	27
	2.2.3 Die Partikelgröße des Aerosols	29
	2.2.4 Quantifizierung mittels LA-ICP-MS	33
	2.2.5 Datenauswertung der ortsaufgelösten Elementdetektion	36
	2.2.6 Softwareentwicklung	39
	2.2.7 Induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie	43
	2.2.8 Ortsaufgelöste Röntgenfluoreszenzanalyse	48
3.	<i>Methoden</i>	51
	3.1 Chemikalien und Gase	51
	3.2 Labor-, Analysengeräte und Zubehör	52
	3.3 Ortsaufgelöste Elementdetektion mittels LA-ICP-MS	53
	3.3.1 Tuning der LA-ICP-MS	54
	3.3.2 Methodenoptimierung der LA-ICP-MS	56
	3.3.3 Quantifizierung der LA-ICP-MS	62
	3.3.4 Ortsaufgelöste Elementanalytik von Gewebeschnitten mittels LA-ICP-MS	66
	3.4 Auswertung der ortsaufgelösten Elementanalytik	68
	3.5 Anfertigung der Mammakarzinomschnitte und Durchführung der immunhistochemischen Analysen	70
	3.6 Ortsaufgelöste Elementanalytik mittels μ-RFA	70
4.	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	72
	4.1 Methodenoptimierung der LA-ICP-MS	72

4.1.1 Untersuchung unterschiedlicher Messzeiten	72
4.1.2 Untersuchung unterschiedlicher Laserstrahldurchmesser	76
4.1.3 Untersuchung unterschiedlicher Ablationsgeschwindigkeiten	78
4.1.4 Berechnung des Abbildungsfaktors	80
4.2 Bestimmung der Elementkonzentration mittels LA-ICP-MS	83
4.2.1 Kalibration	83
4.2.2 Interferenzen	87
4.3 Korrelation der orts aufgelösten Zinkverteilung und der H&E gefärbten Krebszellen des Mammakarzinoms	89
4.3.1 Korrelation der Zinkkonzentrationen und dem Tumorgrading nach Elston und Ellis	90
4.3.1.1 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten invasiv duktalem G1 Mammakarzinom	90
4.3.1.2 Korrelation der Zinkkonzentrationen und dem H&E gefärbten invasiv duktalem G2 Mammakarzinom	95
4.3.1.3 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten invasiv duktalem G3 Mammakarzinom	98
4.3.1.4 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten lobulären und duktalem Mammakarzinom	101
4.3.1.5 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten duktalem und duktalem „in-situ“ Mammakarzinom	107
4.3.2 Literaturvergleich der orts aufgelösten Zinkverteilung in Mammakarzinomen	113
4.3.3 Zinkkonzentrationsvergleich der Karzinomsubtypen	115
4.4 Methodenvergleich zwischen μ-RFA und LA-ICP-MS hinsichtlich der orts aufgelösten Elementverteilung in Mammakarzinomen	122
4.4.1 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktalem G1 Mammakarzinoms	123
4.4.2 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktalem G2 Mammakarzinoms	127
4.4.3 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktalem G3 Mammakarzinoms	129
4.4.4 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	132
4.4.5 Literaturvergleich der orts aufgelösten Röntgenfluoreszenzanalyse von Mammakarzinomen	133
4.5 Untersuchung der Karzinomsubtypen hinsichtlich der Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer	135
4.5.1 Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink	135
4.5.2 Intensitätsverhältnisse der Elemente Kohlenstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen und Kupfer zwischen Krebsgewebe und Stroma	138

4.5.3	Korrelation zwischen weiteren prognostischen Faktoren und der integrierten Zinksignalfläche	146
5.	<i>Zusammenfassung</i>	150
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	153
7.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	170
8.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	172
9.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	180
10.	<i>Anhang</i>	182
10.1	Intensitätsvergleich der Druckerproben zur Methodenoptimierung	182
10.2	Elementkonturplots der Mammakarzinomsubtypen	186
10.2.1	Elementkonturplots des invasiv duktales G1 Mammakarzinoms	186
10.2.2	Elementkonturplots des invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	189
10.2.3	Elementkonturplots des invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	191
10.2.4	Elementkonturplots des invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	193
10.3	Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink	195
10.3.1	Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	195
10.3.2	Streudiagrammanalyse eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	196
10.3.3	Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	197
10.4	Intensitätsvergleich zwischen Krebs- und Stromagewebebereichen der Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer	198
10.5	Korrelation zwischen den Tumormarkern und der Zinkkonzentration	201
11.	<i>Publikationsliste</i>	202
11.1	Lebenslauf	203
11.2	Erklärung	204
11.3	Danksagung	205

1. Einleitung

Das essentielle Element Zink fungiert in annähernd 3000 Proteinen als katalytisch aktive oder strukturgebende Komponente und ist an vielen physiologisch bedeutsamen Reaktionen im humanen Organismus beteiligt [MARET 2009]. Des Weiteren wurden mehr als 2000 Transkriptionsfaktoren entdeckt, die an der Genexpression beteiligt sind und das Zink zur Ausbildung ihrer Struktur sowie zur Bindung an die DNA benötigen [PRASAD 1998].

Aufgrund seiner großen Abundanz im humanen Organismus wird seit den 1980-iger Jahren mittels analytische Methoden der Frage nachgegangen, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß das Element einen Einfluss auf die Karzinogenese des Mammakarzinoms besitzt.

In diesem Zusammenhang fungiert das Zink in unterschiedlichen Proteinen. So schützt es, gebunden an einem Kofaktor der Superoxiddismutase (SOD), Zellen vor der Bildung freier Sauerstoffradikale, welche die Karzinogenese induzieren können. Außerdem wird es im p53 Tumorsuppressorgen für die Bindung an die DNA benötigt und besitzt eine strukturgebende Funktion.

Durch die Beschädigung der DNA oder anderen onkogenen Stresssignalen, aktiviert p53 die Transkription von Genen, die an der DNA-Reparatur, dem Telomer-Abbau oder der Apoptose beteiligt sind. Entscheidend für die Funktion dieser Proteine ist die zelluläre Zinkkonzentration, welche durch die Homöostase gesteuert wird. Eine zu niedrige oder zu hohe Zinkkonzentration führt zur Ausbildung einer inkorrekten Tertiärstruktur des p53 wodurch es seine biochemische Funktion vollständig verliert [LOH 2010].

Die analytischen Untersuchungen der Mammakarzinome in Bezug zur Zinkkonzentration erfolgten ausschließlich als Vergleichsmessungen zwischen dem Tumorgewebe und dem umliegenden krebszellenfreien Gewebe. Die Differenzierung dieser erfolgte mittels histopathologischer Untersuchung.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden, nach Wissen des Autors, neben den Gesamtmetallanalysen lediglich drei ortsaufgelöste Untersuchungen durchgeführt, in denen die Messwerte mit den H&E gefärbten Gewebeschnitten korreliert wurden [FARQUHARSON *et al.* 2008, 2009; DA SILVA *et al.* 2012].

Die Ergebnisse der ausschließlich röntgenspektroskopischen Analysemethoden wiesen jedoch aufgrund unterschiedlicher Probenvorbereitungen und der Verwendung verschiedener Karzinomtypen enorme Variationen auf.

Das Ziel dieser Arbeit ist die ortsaufgelöste Bestimmung der Zinkkonzentration mittels LA-ICP-MS in klassifizierten Mammakarzinomen. Die Brustkrebsgewebe werden durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen nach ihrer lobulären oder duktaalen Differenzierung und dem histopathologischen Malignitätsgrad gruppiert. Anschließend soll eine Korrelationsanalyse der Elementkonturplots mit den H&E gefärbten Gewebeschnitten zeigen, ob in den Krebszellbereichen der unterschiedlichen Karzinome eine Erhöhung oder Erniedrigung der Zinkkonzentration zu verzeichnen ist.

Die eingesetzte massenspektrometrische Analysemethode wird zwar bereits seit etwa einem Jahrzehnten zur ortsaufgelösten Elementdetektion in organischen Proben eingesetzt, findet jedoch erstmalig Anwendung in der Untersuchung von Mammakarzinomen. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass durch die strukturierte Korrelationsanalyse mit den klassifizierten Mammakarzinomen neue Einblicke in die Karzinogese gewonnen werden können. Der gewählte Untersuchungsansatz ist bisher einmalig.

Zur Bestätigung der massenspektrometrisch ermittelten Messergebnisse wird als Komplementärmethode ein Röntgenfluoreszenzspektroskop für die Analyse der Parallelschnitte eingesetzt. Da die Anregung der Probe in Gegensatz zu bereits erfolgten ortsaufgelösten Elementdetektionen nicht mit Synchrotron- sondern

mit Röntgenstrahlung erfolgt, wird diese Untersuchung als Machbarkeitsstudie betrachtet.

Außerdem soll, aufgrund der Vakanz einer kommerziell computergestützten Datenauswertung, eine eigenständig fungierende Software zur Auswertung der orts aufgelösten Elementinformationen entwickelt und in den Routineprozess implementiert werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Zink und das Mammakarzinom

2.1.1 Brustkrebs

Mit rund 72.000 Neuerkrankungen jährlich ist der Brustkrebs die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau (Abbildung 1). Basierend auf diesen Daten erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs.

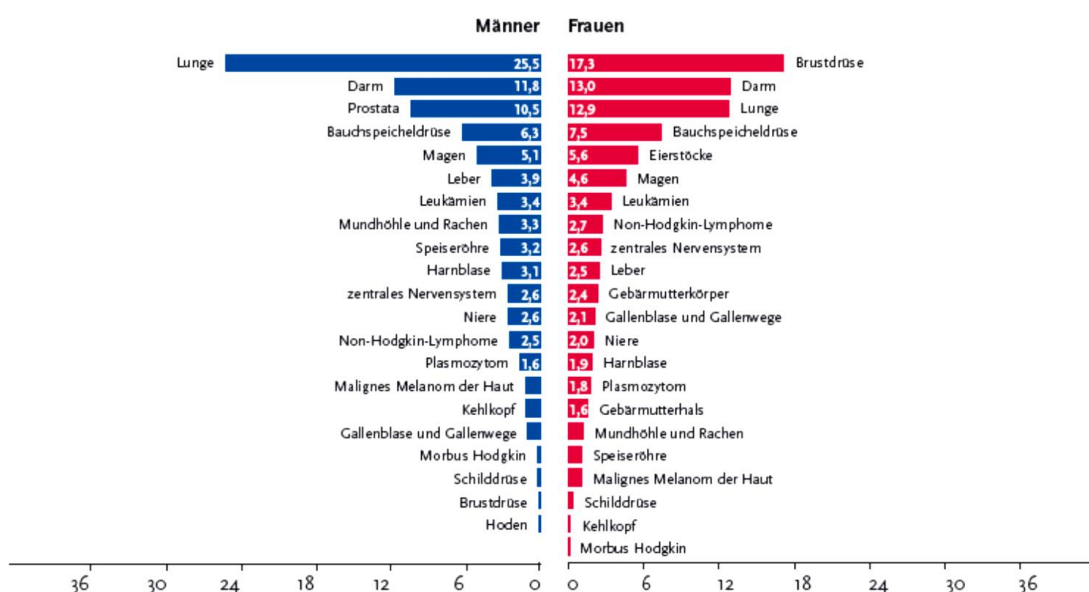


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2008 [Krebs in Deutschland 2007/2008]

Wie eine Studie des Robert-Koch-Instituts zeigt, ist jede vierte betroffene Frau bei der Diagnosestellung jünger als 55 Jahre und jede zehnte noch nicht einmal 45 Jahre alt [Krebs in Deutschland 2007/2008].

Trotz einer deutlichen Zunahme der Erkrankungsrate ab der Einführung des Mammographie-Screenings im Jahre 2005, sterben aufgrund der großen Fortschritte in der Therapie heute weniger Frauen als noch im Jahre 1980.

Durch gesetzliche Früherkennungsprogramme wie die Tastuntersuchung oder das Mammographie-Screening werden Tumore bereits in einem wesentlich

früheren Stadium erkannt und können so schneller und effektiver behandelt werden.

2.1.2 Progenitorzellkonzept des Mammaepithels

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Karzinogenese von Bedeutung sind, erheblich verbessert [SAUER *et al.* 2002]. Die Analyse von unterschiedlichen tumorspezifischen Veränderungen gibt die Möglichkeit den Verlauf und den Therapieansatz individuell auf den diagnostizierten malignen Phänotyp abzustimmen. Neben dem bisher am längsten und aufwändigsten untersuchten Östrogenrezeptor und den stark divergierenden Expressionen bei HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), einem epidermalem Wachstumsfaktor, gibt der enorme Informationszuwachs durch die Anwendung der cDNA-Mikroarray-Technik, einen deutlichen Hinweis auf die große Heterogenität der Erkrankung.

Zur zellbiologischen und molekulargenetischen Erklärung der Karzinogenese des Mammakarzinoms werden von der WHO die proliferativen Prozesse des Mammaepithels genutzt, um die unterschiedlichen Phänotypen zu klassifizieren [LAKHANI *et al.* 2012]. Anhand von Immunfluoreszenzmikroskopie und zellbiologischen Untersuchungen konnte mittels des Progenitorzellkonzepts des Mammaepithels gezeigt werden, dass das normale Mammaepithel Ck5/14+-Progenitorzellen (Ck = Cytokeratin) enthält, welche sich während der Erkrankung zu glandulär (Ck8/18+) und myoepithelial differenzierten Zellen (CD10+, SMA+) entwickeln.

Während benigne proliferative Läsionen Ähnlichkeiten mit dem normalen Epithel zeigen, exprimieren invasive Karzinome etwa 90 % glanduläre Cytokeratine wie z.B. Ck8/18. Diese Phänotypen bilden die Klasse der luminalen Karzinome. Dem gegenüber stehen mit 10 % die basalzelltypischen Karzinome, welche überwiegend hoch maligne Tumore mit Ck5/14 Expression darstellen.

Eine mögliche Entstehung der Mammakarzinome verläuft aus dem glandulären Epithel der normalen Brustdrüse über die Stationen der Benigne (z.B. duktale Hyperplasie) zu einer nicht-invasiven Vorläuferläsion (z.B. duktales Karzinom in situ (DCIS)) und letztendlich zu einem invasiven Karzinom [MOINFAR 2007].

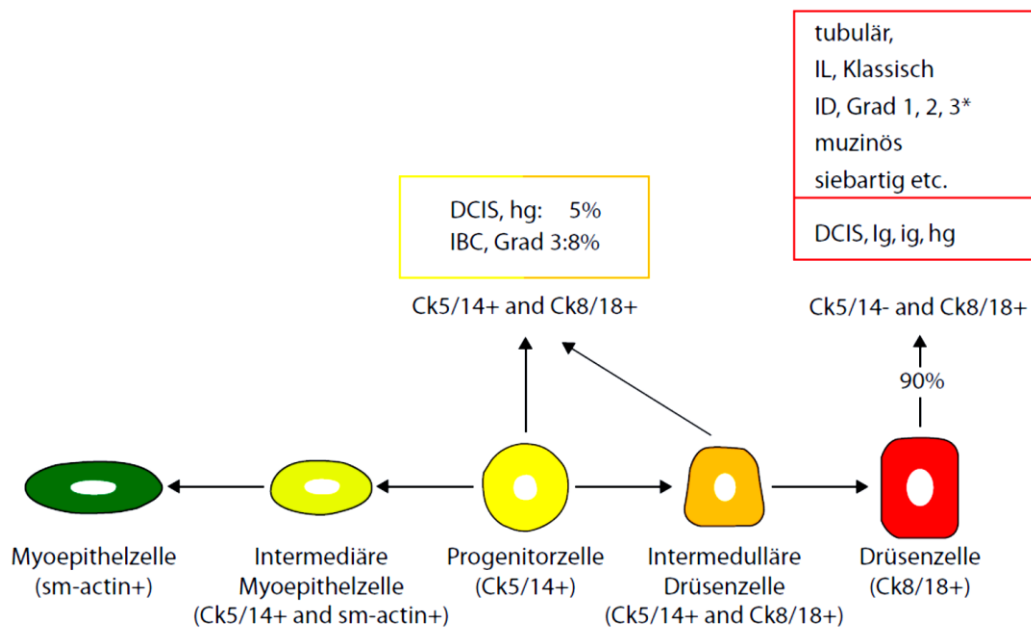


Abbildung 2: Hypothetisches Modell der Mammakarzinomentwicklung auf der Grundlage des Progenitorzellkonzepts [BÖCKER UND DECKER 2008]

In Abbildung 2 ist ein hypothetisches Modell der Mammakarzinomentwicklung dargestellt. Die luminalen Karzinome zeigen eine Expression von Ck8/18 während ein deutlich kleinerer Teil, die sogenannten basalzelltypischen Karzinome, konstitutiv Ck5/14 exprimieren oder koexprimieren.

2.1.3 Die Subtypen des Mammakarzinoms

Obwohl die Anzahl der Tumormarker in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen hat, ist die Bestimmung von Tumortypen und dem Grading an Biopsien, also die morphologische Untersuchung, nach wie vor der so genannte „gold standard“.

Bei einer Klassifikation der Mammakarzinome können 45-90 % den Subtypen invasiv-duktalem (invasive ductal carcinoma = IDC), von den Milchgängen, sowie dem invasiv-lobulären (invasive lobulare carcinoma = ILC), von den Drüsenlappen ausgehenden, Mammakarzinom zugeordnet werden.

Das ILC, welches 5 – 15 % aller Karzinome ausmacht [LAKHANI *et al* 2012], zeichnet sich durch ein infiltrierendes, unregelmäßiges, diffuses Wachstum aus. Diese Eigenschaft ist durch den Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin begründet wodurch eine makroskopische Größenbestimmung, aufgrund eines nichtvorhandenen Krebszellenherds, erschwert ist. Die nicht kohäsiv auftretenden Krebszellen dringen in fadenartigen Einzelreihen (Abbildung 3), so genannten „indian file pattern“ in das Stroma ein [ELLIS *et al.* 1992]. Die schnürartig aneinandergereihten Krebszellen wachsen sehr oft konzentrisch um einen Milchkanal in der Brust herum [LAKHANI *et al* 2012].

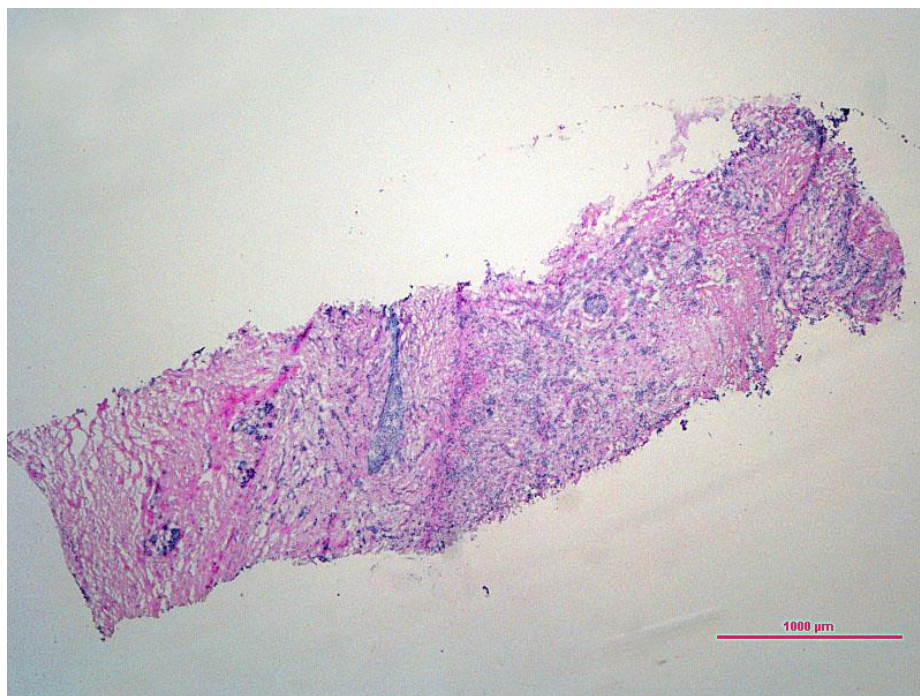


Abbildung 3: Ein mit H&E gefärbter Gewebeschnitt eines invasiv lobulären Mammakarzinoms. Die Krebszellen sind dunkel blau gefärbt

Das IDC hingegen formt große Krebszellenherde, welche durch das vorhandene Adhäsionsmolekül E-Cadherin, als polygonale kohäsiv wachsende Zellverbände

auftreten (Abbildung 4). Im Gegensatz zum ILC tritt das invasiv-duktales Mammakarzinom in 40 % - 75 % aller Karzinome auf. Die große Varianz ist den unspezifischen Kriterien geschuldet, da dieser Subtyp laut WHO als „invasive carcinoma of no special type“ bezeichnet wird [LAKHANI *et al* 2012]. Dieser Karzinomtyp zeigt keine spezifisch makroskopischen Eigenschaften und besitzt eine Größe zwischen 10 mm und 100 mm.

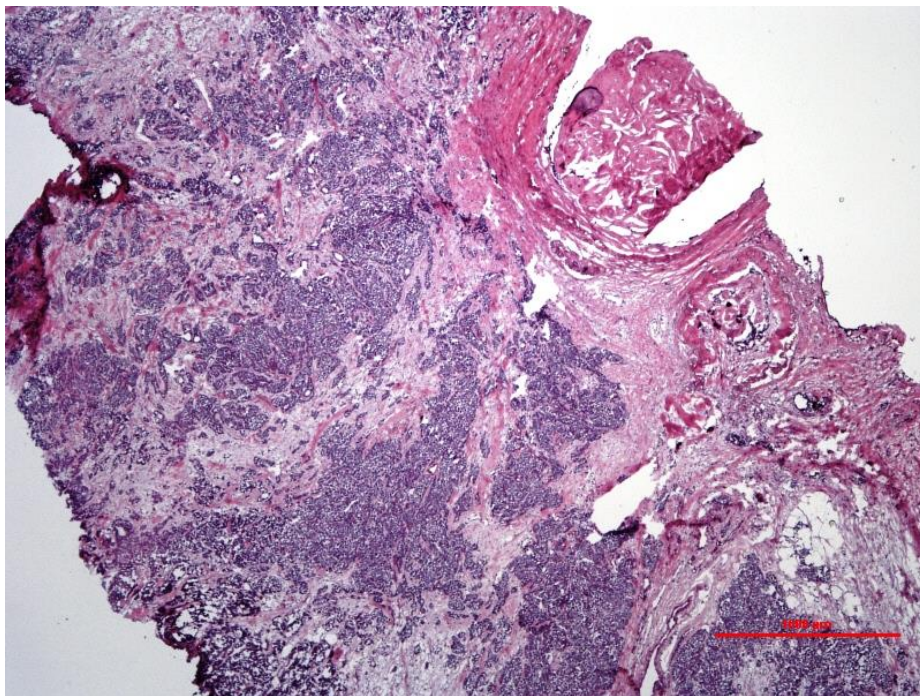


Abbildung 4: H&E gefärbter Gewebeschnitt eines invasiv duktales Mammakarzinoms. Die Krebszellen sind dunkel blau gefärbt

Neben den überwiegend invasiv wachsenden Karzinomen, lassen sich in über 80 % der Befunde „In-situ“ Komponenten nachweisen. Dies sind Tumorzellen, die sich noch im Drüsengang befinden und noch nicht in umliegendes Gewebe infiltriert sind. Auf weitere Phänotypen wie das tubuläre oder das medulläre Karzinom wird hier nicht näher eingegangen.

2.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Im Zuge der heutzutage angestrebten individualisierten Therapie des Mammakarzinoms gewinnen die prognostischen und prädiktiven Faktoren zunehmend an Bedeutung. Die Prognosefaktoren haben das Ziel den Krankheitsverlauf in Bezug auf Rezidiv- und Metastasierungsrisiko mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit voraus zu sagen, während die prädiktiven Faktoren sich auf die Vorhersage des Effekts einer adjuvanten Therapie beziehen. Nach dem internationalen Konsens von St. Gallen 2007 [GOLDHIRSCH *et al.* 2007] und der American Association of Clinical Oncology [HARRIS *et al.* 2007] ergeben sich folgende Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz:

- Tumorgröße
- Axillärer Lymphknotenstatus
- Grading
- Histologischer Tumortyp
- Hormonrezeptorstatus
- HER-2 Status.

Neben diesen Prognosefaktoren werden unzählige weitere morphologische, biochemische oder genetische Einflussgrößen diskutiert.

Der aussagekräftigste Prognosefaktor ist im Moment der axilläre Lymphknotenstatus, welcher je nach Anzahl der befallenen Lymphknoten mit der Rezidiv- bzw. Mortalitätsrate korreliert. Dieser Prognosefaktor wird in Rahmen der TNM-Klassifikation nach der WHO histopathologisch beschrieben [LAKHANI *et al.* 2012].

Der erste Faktor dieser Klassifikation ist die Tumorgröße (T), welche sich bei den meisten Patienten nach der Größe des Invasivtumors richtet. Liegt mehr als nur ein Tumorherd vor, wird der Herd mit der größten Masse angegeben und die

Kleineren durch eine zusätzliche Kennzeichnung (die Anzahl oder ein (m)) festgehalten. Je nach der Größe des Tumors werden Zahlen zwischen eins und fünf vergeben.

Die zweite Kategorie beschreibt die regionären Lymphknoten (N), welche anhand von dünnen histologischen Schnitten untersucht werden, um alle Makrometastasen ($> 0,2$ cm) in dem Lymphknotengewebe zu detektieren [LAKHANI *et al* 2012].

Der dritte Faktor identifiziert die Fernmetastasen in anderen Organen, welche durch histopathologische Untersuchungen des entsprechenden Gewebes bestimmt werden. Dadurch, dass keine speziellen Techniken für diese Klassifizierung benötigt werden, können weltweit vergleichbare Informationen gesammelt werden. Diese werden bevorzugt für klinische oder epidemiologische Studien eingesetzt.

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Beurteilung des Malignitätsgrades des Mammakarzinoms. Bei dieser histologischen Analyse wird anhand der glandulären Differenzierung, der Kernpolymorphie und der Mitosezahl pro definierte Fläche eine Klassifizierung vorgenommen. Anhand der Zellveränderungen konnte in vielen Studien eine signifikante Korrelation zwischen dem histologischen Grading und der Überlebensrate von Patienten mit einem invasiven Mammakarzinom aufgezeigt werden. Das international anerkannte Gradingssystem wurde von Patey und Scarff [PATEY UND SCARFF 1928] später von Bloom und Richardson [BLOOM UND RICHARDSON 1957] weiterentwickelt und schließlich von Elston und Ellis im Jahre 1991 modifiziert [ELSTON UND ELLIS 1991].

Die Methode basiert auf einem numerischen Auswertesystem. Jedem Merkmal wird ein Faktor zwischen eins und drei zugeordnet. Die glanduläre Differenzierung, ein eher schwaches Beurteilungskriterium, wird anhand des vollständigen Tumors vermessen, während die Kernpolymorphie lediglich in

den Krebszellen beurteilt wird. Die Mitosezahl wird in den Gebieten gezählt, in denen die größte Proliferationsrate vorherrscht [LAKHANI *et al* 2012].

Abschließend werden die Faktoren aufsummiert um mit dem nachfolgend abgebildeten Schema einen Befund (Differenzierungsgrad) mit prognostischer Relevanz zu erhalten.

Tabelle 1: Bemessungsgrundlage für das histochemische Grading nach Elston und Ellis

3-5 Punkte	Grad 1	Gut differenziert
6-7 Punkte	Grad 2	Mäßig differenziert
8-9 Punkte	Grad 3	Schlecht differenziert

Da das Mammakarzinom in seinem Wachstum hormonellen kontrolliert wird, findet neben der TNM Klassifikation und der Bestimmung des Malignitätsgrades die Ermittlung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus statt. Dieser dient sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Parameter und signalisiert bei positivem Befund eine günstigere Prognose.

Der Östrogenrezeptor (ER = estrogen receptor) ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor, welcher bei einer Aktivierung durch das Östrogenhormon das Wachstum der Brustepithelzellen stimuliert. Außerdem reguliert der Östrogenrezeptor die Expression des Progesteronrezeptors (PR = progesteron receptor), so dass die PR-Detektion in einer Vielzahl von Untersuchung ein sehr guter Indikator für einen intakten, aktiven Östrogenrezeptor ist [CLARKE 2003].

In 80 % aller immunhistochemisch analysierten invasiven Mammakarzinome wird eine Expression des ER ermittelt.

Der Progesteronrezeptor stimuliert seinerseits, nach der Expression durch ER und der Aktivierung durch das Progesteronhormon, das Wachstum der Tumorzellen [ANDERSON 2002]. In 60-70 % aller untersuchten Mammakarzinome werden im Zellkern sowohl ER als auch PR detektiert.

Ein weiterer prognostischer Faktor ist das HER-2 Status. Das HER-2 Gen ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert und wird von einer Vielzahl von Epithelzellen zur Stimulation des Zellwachstums exprimiert [HARRIS 2010]. Studien zeigen eine Amplifikation des HER-2 Gens um 15 % bei Patienten mit einem primären Mammakarzinom [ALLRED *et al.* 2010]. Die Überexpression von HER-2 ist in vielen Fällen ein Indiz für eine erhöhte Aggressivität und eine daraus resultierend verringerte krebsfreie Überlebenszeit.

Neben dem Hormonrezeptorstatus der Mammakarzinome, wird zur Bestimmung der Wachstumsfraktion mittels immunhistochemischer Analyse der Proliferationsaktivitätsmarker Ki-67 untersucht. Durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 kann ein proliferationsassoziiertes Protein in den Zellzyklen G1-, S-, sowie G2- und M-Phase nachgewiesen werden. Da dieses in der G0 Phase nicht detektiert wird, zeigen die gefärbten Zellen die Proliferationsaktivität an [HAYAT 2008].

2.1.5 Zink und die Karzinogenese

Das essentielle Spurenelement Zink ist durch seine strukturformende Eigenschaft in einer Vielzahl von Proteinen, Enzymen, Rezeptoren, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren vorhanden [PRASAD 1995].

Nach einer bioinformatischen Human-Genom-Studie binden ungefähr 10 % aller Proteine das Element Zink [ANDREINI *et al.* 2006]. Eines dieser Proteine ist die Superoxiddismutase (SOD), welches durch die Übertragung von Elektronen in der Lage ist, die Zelle vor den schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) zu schützen. Bekannt ist seit längerem, dass die Sauerstoffradikale, durch die Reaktion mit der DNA, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krebs einnehmen [HARTWIG 2000, BORRELLO *et al.* 1993].

Auf der anderen Seite induzieren Metalle wie Eisen, Kupfer oder Zink die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche eine DNA-Schädigung hervorrufen können. Des Weiteren wird vermutet, dass die ROS in den Zellen als sekundärer Botenstoff eine intrazelluläre Signalkaskade zur Induktion von Onkogenen auslösen [VALKO *et al.* 2006, BISHOP *et al.* 2007].

Neben diesen schützenden und schädigenden Eigenschaften ist weiter zu erwähnen, dass das Zink an DNA-Reparaturproteinen beteiligt ist, wie z.B. dem p53 [GASCO *et al.* 2002]. In diesem Zusammenhang ist zu sagen, dass sowohl ein Mangelzustand als auch eine Überladung der zellulären Zinkkonzentration zur induzierten Apoptose führen kann [WÄTJEN *et al.* 2002].

Untersuchungen von Arslan haben gezeigt, dass die intrazelluläre Zinkkonzentration einige 100 μM beträgt und sich in zwei Gruppen aufteilt [ARSLAN *et al.* 1985]. Die kleinere Gruppe liegt als verfügbares Zink vor und ist nur über schwache Wechselwirkungen an Proteine gebunden, während der größere Teil des Zinks eine starke Wechselwirkung mit den Proteinen ausbildet [HAASE UND BEYERSMANN 1999].

Ein Zinkdefizit kann unter anderem durch eine Chelatisierung ausgelöst werden und führt in verschiedenen Zelltypen von Säugetieren zum programmierten Zelltod [McCABE *et al.* 1993].

So konnte Haase zeigen, dass durch die Chelatisierung von Zink durch den membrangängigen Zinkchelator N,N,N',N'-terakis (2-pyridylmethyl) ethylendiamin (TPEN) eine internukleosomale DNA-Fragmentierung eintritt [HAASE UND BEYERSMANN 1999]. Dies ist ein charakteristischer Prozess in der Zellapoptose, in dem durch die Proteolyse der DNA-Gerüstkomponente Lamin eine Destabilisierung der Kernmembran und Kondensation des Chromatins hervorgerufen wird. Anschließend wird die DNA durch DNasen in den internukleosomalen Regionen in einzelne DNA-Fragmente aufgespalten [SAKAHIRA *et al.* 1998].

2.1.6 Elementspezifische Untersuchungen an Mammakarzinomen

Die Vielzahl von Wechselwirkungen in unterschiedlichen physiologisch aktiven Molekülen hat des Spurenelements Zink in den Fokus der ortsausgelösten und elementsensitiven Methoden gerückt. Diesbezüglich wird im Folgenden ein kurzer Überblick in einige Untersuchungen gegeben.

Silva untersuchte Mammakarzinomgewebe mittels eines Synchrotron-Röntgenfluoreszenzspektroskops (synchrotron radiation x-ray fluorescence, SC-XRF) auf die Elemente Kupfer, Eisen und Zink und zeigt, dass die Zinkkonzentrationen in neoplastischem Gewebe gegenüber dem umliegenden unbelasteten signifikant erhöht ist [SILVA *et al.* 2008]. An der Studie nahmen 26 Patienten teil, denen während der Mastektomie neoplastisches und normales Brustgewebe entnommen wurde. Die Proben wurden in Formalin (10 % Formaldehyd in Wasser) gelagert und vor der Analyse in Schnitte mit einer Schichtdicke von 0,5 cm zerteilt. In Tabelle 2 ist ein Konzentrationsvergleich aus der Publikation aufgelistet.

Tabelle 2: Statistik von Zinkkonzentration in Brustgewebe [SILVA *et al.* 2008]

Zinkkonzentration in µg/g		
	Gesundes Gewebe	Neoplastisches Gewebe
Bereich	1,0-8,6	2,2-29,9
Mittelwert	3,8	12,9
Median	3,2	12,2

Das Ziel der Studie von Al-Ebraheem [AL-EBRAHEEM *et al.* 2010] ist es zu vergleichen, ob das Element Zink in gebundener oder ungebundener Form in normalen und Tumorgewebe vorhanden ist. Die Untersuchungen wurden an 30 FFPE-Gewebeschnitten (formalin-fixed paraffin-embedded) mittels einer Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (XANES = X-ray absorption near-edge structure) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass für das Element Zink fast vollständig identische Analysensignale detektiert wurden, so dass es sowohl in normalen als auch im Tumorgewebe zu einem großen Teil in gebundener Form vorliegt.

Geraki [GERAKI *et al.* 2004] verwendet ebenfalls eine synchrotronbasierte Analyseverfahren um die Konzentration von Eisen, Kupfer, Kalium und Zink in Brustkrebsgeweben zu bestimmen. Die Quantifizierung mittels Energiedispersiver-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie (EDXRF = Energy-dispersive X-Ray fluorescence spectroscopy) ergab eine Konzentration des normalen Gewebes von 1,69 ppm (parts per million) und von 7,12 ppm für das Tumorgewebe. Da hier eine Gesamtanalyse durchgeführt wurde beziehen sich die ermittelten Werte auf den errechneten Median.

Abschließend kann man resümieren, dass in der Literatur publizierten Analysenergebnisse eine große Varianz aufweisen. Dies wird durch die in Tabelle 19 (S.120) und Tabelle 22 (S.142) aufgelisteten Messergebnisse sehr gut veranschaulicht.

2.2 Ortsaufgelöste Elementanalytik in biologischen Proben

Aufgrund der großen physiologischen Bedeutung der Metalle in vielen Organismen haben die ortsaufgelösten elementanalytischen Techniken in den letzten Jahren großer Beliebtheit in der Biologie, der Biochemie und nicht zuletzt auch der Medizin erlangt [QIN *et al.* 2011]. Durch modernere Methoden ist es möglich heteroatomgebundene Proteine in biologischen Proben wie z.B. dem humanen Gewebe quantitativ und ortsaufgelöst, bis in den Mikrometerbereich, zu detektieren und so Krankheitsverläufe, Therapieansätze oder Metabolismusstudien zu unterstützen.

Neben den lebenswichtigen Eigenschaften der Metalloproteine in der zellulären Regulation und Signalübertragung, kann durch den Überschuss oder den Mangel direkt oder indirekt eine Krankheit ausgelöst werden. Dies zeigt sich z.B. bei Morbus Wilson, bei dem eine Mutation im Gen ATP7B zu einem Defekt im Kupfer transportierenden Enzym P-Type-ATPase führt [WILMARTH *et al.* 2012]. Die Kupferakkumulation führt zu Leberschäden und neurologischen und psychiatrischen Störungen.

In Abbildung 5 sind alle mikroanalytischen Techniken mit ihrem lateralen Auflösungsvermögen und dem detektierbaren Konzentrationsbereich grafisch dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, decken die μ -XRF, die LA-ICP-MS und die SIMS Methoden einen großen Bereich des Graphen ab.

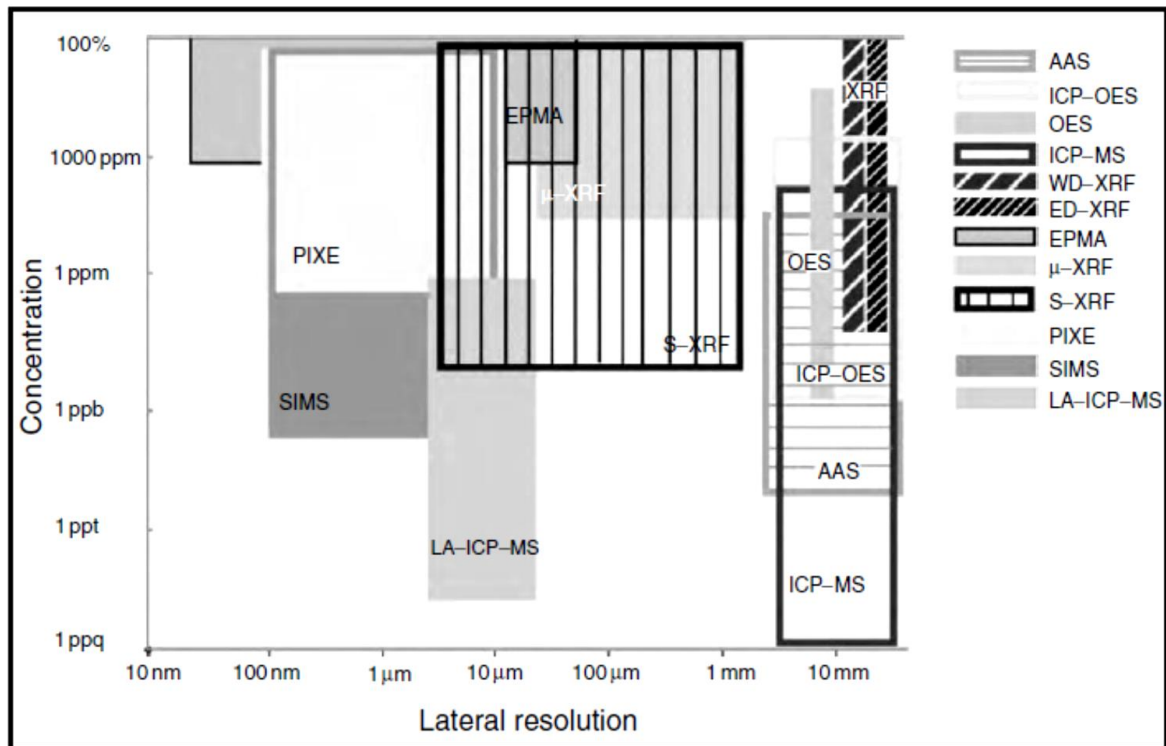


Abbildung 5: Analytische Methoden und deren laterale Auflösung und Nachweisgrenzen [Beckhoff 2006]

Im Folgenden werden kurz, zwei der drei am stärksten vertretenden orts aufgelösten Elementdetektionstechniken beschrieben.

Bei der Synchrotron-Röntgenfluoreszenzanalyse (SRXRF=synchrotron radiation X-ray fluorescence spectroscopy) werden durch einen Röntgenstrahl die kernnahen Elektronen so stark angeregt, dass diese das Atom und bei hinreichend geringem Abstand zur Materialoberfläche und größere Energie als der Bindungsenergie auch das Material verlassen. Das unbesetzte Orbital wird durch ein Elektron aus einem energetisch höher liegenden Orbital unter Emission von Fluoreszenzstrahlung wieder besetzt. Aufgrund der charakteristischen elementspezifischen Strahlung ist diese Methode multielementfähig [QIN *et al.* 2011]. Außerdem können sowohl qualitative als quantitative topographische Information mit der SRXRF erzeugt werden. Weitere Eigenschaften dieser Messtechnik sind die zerstörungsfreie Analyse, die örtliche Auflösung von maximal 150 nm und eine Nachweisgrenze im sub-ppb

Bereich. Eine Limitation in der Nutzbarkeit der Methode ist, dass global nur wenige Messeinrichtungen vorhanden sind [ORTEGA *et al.* 2008].

Neben dem SRXRF gibt es auch bildgebenden röntgenstrahlbasierte Techniken als sogenanntes „bench-top“ Gerät. Hier sind die elektronenmikroskopischen Methoden wie scanning electron microscopy (SEM) oder transition electron microscopy (TEM) zu nennen, welche zusätzlich mit einem energiedispersiven Röntgendetektor ausgestattet sein können (transmission electron microscopy – energy dispersive spectrometry, TEM-EDS). Außerdem ist seit einigen Jahren ein Mikro-XRF kommerziell erhältlich. Diese Methode besitzt eine örtliche Auflösung von 30 µm und eine Nachweisgrenze im Bereich zwischen 10-100 ppm. Jedoch ist die Elementsensitivität der röntgenspezifischen Methoden aufgrund der Bremsstrahlung im Vergleich zur SRXRF deutlich schlechter [BECKHOFF *et al.* 2006].

Die Sekundär-Ionisations-Massenspektrometrie (SIMS) ist eine Methode, bei der die Probenoberfläche mittels eines primären Ionenstrahls bestrahlt wird. Hierbei handelt es sich in der Regel um Argon, Gold oder Bismutkluster. Die Methode wird als bildgebende Technik zur Detektion von Elementen, Isotopen oder Molekülen und zur Tiefenprofil- und Spurenanalytik genutzt.

Durch die Wechselwirkung des primären Ionenstrahls mit der Probenoberfläche werden positive und negative Sekundärionen erzeugt, welche anschließend in ein doppelt fokussiertes Sektorfeld, einem quadropolbasierten oder Flugzeitmassenspektrometer analysiert werden. Die laterale Auflösung liegt im mittleren Nanometerbereich und die Nachweisgrenze bei einem ppm [ORTEGA *et al.* 2008]

2.2.1 LA-ICP-MS zur orts aufgelösten Elementanalytik

Die Laser-Ablation induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) ist eine Methode zur orts aufgelösten, „quasi-zerstörungsfreien“ Mikroanalyse von Elementen in einer festen Matrix. Das Grundprinzip der Methode basiert auf der Wechselwirkung eines hochenergetischen Laserstrahls mit der Probenoberfläche, wodurch bei ausreichend hoher Energie ein Aerosol aus Partikel und Probendampf entsteht. Im Folgenden wird das Probenaerosol mit dem Transportgas, hier wird entweder Argon oder Helium verwendet, in das Massenspektrometer geleitet. Dort werden die Probenpartikel verdampft, atomisiert, ionisiert und anschließend die enthaltenden Elemente nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis getrennt.

Die analytische Methode wurde erstmals 1985 von Gray vorgeschlagen [GRAY 1985], der hiermit eine weitere Probenaufgabevariante von festen Proben für ein ICP-MS oder ICP-AES (induktiv gekoppeltes Plasma-Atomemissionsspektrometer) etablierte.

Der typische Aufbau eines LA-Systems besteht aus einem Laser, einer Ablationskammer und einer Detektionseinheit (siehe Abbildung 6).

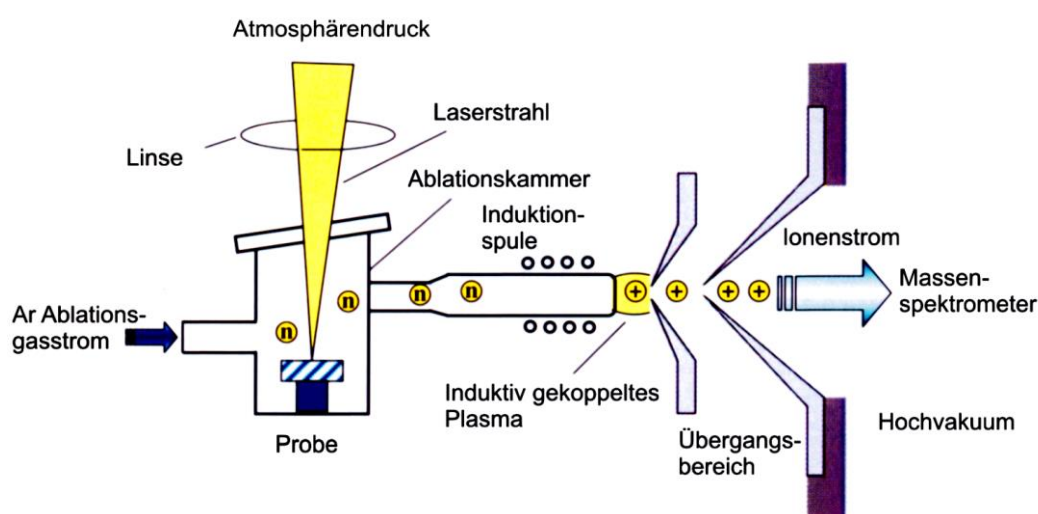


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines LA-ICP-MS [Becker 2007]

Die Probe wird auf eine computergesteuerte Bühne gelegt, welche sowohl in x-, y- als auch in z-Richtung bewegt werden kann. Dies erfolgt über Schrittmotoren, welche durch eine softwarebasierte Steuerung die Probe im Mikrometerbereich steuern können. Der Laserstrahl wird durch den mit einem Glasfenster versehenen Ablationskammerdeckel eingestrahlt. Mittels einer CCD-Kamera (Charge-coupled Device) wird der Laserstrahl auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Lasereinstellungen wie Energiedichte, Frequenz oder Laserstrahldurchmesser werden ebenfalls softwaregestützt eingestellt.

In der Entwicklungsphase dieser Methode wurden Rubin Laser verwendet, welche heutzutage weitestgehend durch den häufig verwendeten Nd:YAG Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat Laser) verdrängt worden sind. Dieser Festkörperlaser typ eignet sich aufgrund einer kostengünstigen Anschaffung als auch einer geringen Wartung. Neben einer Vielzahl anderer Lasertypen werden ebenfalls häufig ArF (Argonfluorid) Excimerlaser eingesetzt. Ein grundlegendes Entscheidungskriterium für einen in einer Laser-Ablation Apparatur verwendeten Laser ist die Wellenlänge. Diesbezüglich konnten Arbeiten von Guillion [GUILLONG *et al.* 2003] und Kuhn und Günther [KUHN UND GÜNTHER 2004] zeigen, dass je kürzer die Wellenlänge des eingesetzten Lasers, desto niedriger die Fraktionierungseffekte beim Ablationsprozess.

Die erzeugten Probenpartikel werden durch einen Ablationsgasstrom in den Detektor transportiert. Als Gase finden sowohl Argon als auch Helium Verwendung, wobei gezeigt werden konnte, dass Letzteres durch seine geringere atomare Masse, die kleinere Viskosität und eine größere Wärmeleitfähigkeit besser für den Ablationsprozess geeignet ist. Hier konnte Koch [KOCH *et al.* 2007] zeigen, dass durch den Einsatz von Helium die vertikale Expansion der „Ablationswolke“ um einen Faktor von vier größer ist als bei der Verwendung von Argon. Dadurch wird einer Koagulation der

Aerosolpartikel, durch die eine Redeposition auf der Probenoberfläche hervorgerufen werden kann, entgegen gewirkt.

Als Detektor werden hauptsächlich Quadrupol-(qICP-MS) oder Sektorfeld-ICP-MS (SF-ICP-MS) eingesetzt. Durch die quasi-simultane Elementdetektion eignet sich die qICP-MS hervorragend zur Analyse der ablierten Probenpartikel. Außerdem werden auch ICP-AES (inductive coupled atomic emission spectrometer) verwendet.

Die Einsatzgebiete des LA-ICP-MS erstrecken sich über einen großen Bereich. Die Hauptanwendung liegt in den Analysen von geologischen Proben wie Gesteinen oder Meteoriten. Seit einigen Jahren werden jedoch verschiedene massenspektrometrische Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung heteroelemententhaltender Biomoleküle wie Enzymen oder Proteinen eingesetzt [SZPUNAR 2005]. Neben der Kopplung chromatographischer und elektrophoretischer Techniken mit einem ICP-MS wird die Laser-Ablation als Probenaufgabesystem sowohl für die Analyse von elektrophoretisch getrennten heteroelemententhaltenden Proteinen aus einem Acrylamidgel, als auch zur Elementdetektion von Gewebeschnitten genutzt [DURRANT UND WARD 2005, BECKER *et al.* 2007,2008].

2.2.2 Der Ablationsprozess

Der Prozess der Laser-Ablation umfasst die Erzeugung eines Probenaerosols aus verdampfter Materie und Feststoffpartikeln, welches durch die Wechselwirkung eines fokussierten hochenergetischen Laserstrahls mit einer festen Oberfläche gebildet wird. Auf diesen Vorgang haben Parameter wie z. B. die Wellenlänge des verwendeten Lasers, die Energiedichte, der Laserstrahldurchmesser, die Frequenz des Lasers sowie die Größe der Ablationskammer und die ablierte Materie erheblichen Einfluss.

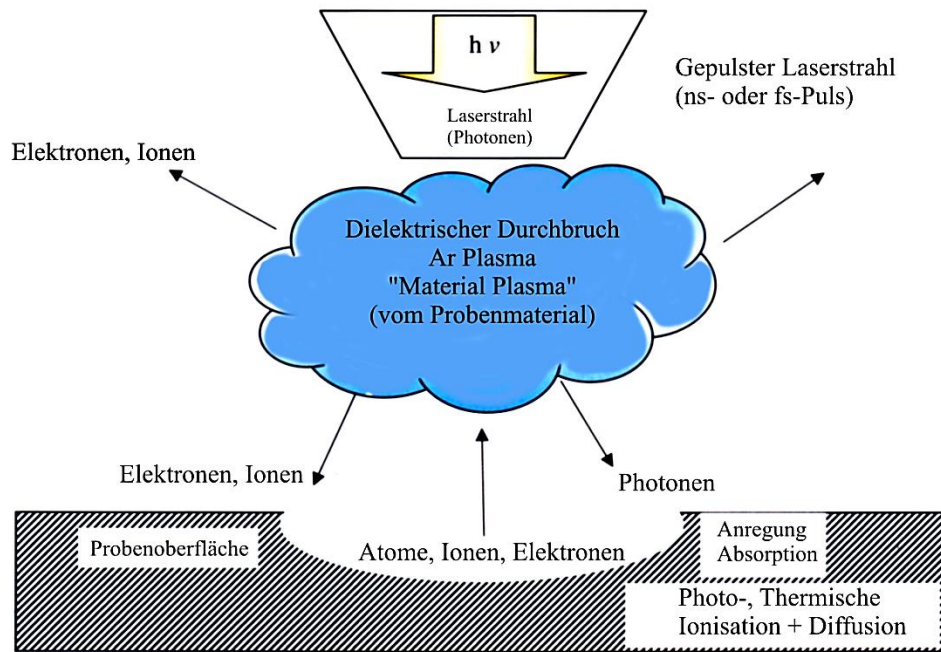


Abbildung 7: Schematische Abbildung der Photonen-Feststoff Wechselwirkung während der Laser-Ablation. [BECKER 2007]

Trifft der Laserstrahl auf eine feste Probe, so wird ein Teil der Strahlung von der Probe absorbiert, während ein anderer Teil reflektiert wird [BLEINER 2005].

Der Ablationsprozess kann für eine Laserquelle mit einer Pulsdauer von einigen Nanosekunden durch zwei Modelle beschrieben werden. Durch die Energieübertragung wird die Probe lokal erwärmt, so dass ein Teil der Probe durch den anschließenden Schmelz- und Verdampfungsprozess in die Gasphase expandiert [BOGAERTS *et al* 2003].

Der zweite Ansatz beschreibt die Anregung und den Austritt der Elektronen aus dem Feststoff bei Überschreitung des Elektronenaustrittspotentials [MAO *et al.* 1998]. Durch die Art der Elektronenpromotion entsteht ein positiv geladener Feststoff [GAMALY *et al.* 2002], aus dem aufgrund der Coulombabstoßung Atome oder auch Ionen zusammen mit Feststoffpartikeln herausplatzen (engl. sputtering). So bildet sich innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls eine geladene „Wolke“ von Elektronen, Atomen, Ionen und neutralen Feststoffpartikeln, welche im Folgenden in den umgebenen Gasraum expandieren (Abbildung 7).

Die räumliche Ausdehnung ist ein sehr komplexer Vorgang, den Harrilal [HARRILAL *et al.* 2003] in drei zeitlich aufeinanderfolgende Prozesse unterteilt hat. Im Ersten findet in einem Zeitregime von 40-50 ns eine adiabatische Expansion statt, welche von dem Umgebungsdruck unabhängig ist. Der anschließende zweite Bereich umfasst die Initiierung einer Schockwelle durch die im Ultraschallbereich expandierenden Atome, Ionen und Feststoffpartikel [HAUER *et al.* 2004]. Durch die Schockwelle entstehen lokale Temperatur-, Druck- und Dichtegradienten, welche sich grundlegend von den umgebenden Ablationskammerbedingungen unterscheiden. Im abschließenden dritten Bereich wird die Expansion in einem Zeitfenster zwischen 500-700 s am besten durch ein Umgebungsgaswiderstandsmodell beschrieben. Ausgehend von diesen Theorien kann die Wechselwirkung zwischen dem Laserstrahl und der Probe unter bestimmten Annahmen präziser beschrieben und berechnet werden. Hierzu hat Bleiner [BLEINER 2005] ein theoretisches Modell entwickelt, welches auf einer bimodalen Partikelgrößenverteilung basiert. Es umfasst zum einen die Nanopartikel, welche in der expandierenden „Ablationswolke“ kondensieren, und zum anderen jene mikrometergroße Partikel, die aus der geschmolzenen Oberfläche ausgestoßen werden. Dieser Ansatz lieferte einige Antworten auf einfache analytische Zusammenhänge in der LA-ICP-MS Analytik, wie z. B. wie groß die Partikelgrößenverteilung bei gegebenem Laserstrahldurchmesser und vorgegebenen physikalischen Eigenschaften der Probenmatrix ist.

2.2.3 Die Partikelgröße des Aerosols

Die Partikelgrößenverteilung besitzt erheblichen Einfluss auf die Vollständigkeit der Verdampfung, Atomisierung und Ionisierung der Probenpartikel und somit auf die Empfindlichkeit, Genauigkeit und Präzision des Analyseergebnisses [KUHN UND GÜNTHER 2003]. Durch den Eintrag von Partikeln mit unterschiedlicher Masse und Größe ändern sich die Plasmabedingungen, wodurch die Ionisationseffizienz stark beeinträchtigt wird.

Bei der Feststoffanalytik mittels SN-ICP-MS wird die gelöste Probe über einen Zerstäuber in die Sprühkammer eingetragen. Der Zerstäuber erzeugt, je nach Volumenfluss der Probe, nach Art des Zerstäubers und den physikochemischen Eigenschaften der Probe, ein polydispersives Aerosol mit einem Tropfendurchmesser von 0,5–100 µm.

Die Flüssigkeitstropfen werden in die Sprühkammer eingetragen, in der alle Tropfen mit einem Durchmesser von $> 10\text{ }\mu\text{m}$ aufgrund von Gravitationskräften und Strömungseigenschaften abgeschieden werden. Das eingeleitete Aerosol besitzt elementaren Einfluss auf die Eigenschaften des Plasmas. So ändert sich die Plasmagas- und Elektronentemperatur, die Elektronendichte und damit letztendlich auch der Verdampfungs-, Atomisierungs- und Ionisierungsprozess [MONTASER 1998]. Nach wie vor ist die Probenaufgabe der limitierende Faktor der Plasma-Massenspektrometrie.

Der Vergleich der Durchmesser eingetragener Partikel bei der Feststoffprobenaufgabe durch die Laser-Ablation mit einem Flüssigaufgabesystem führt zu dem Ergebnis, dass ein wesentlich größeres Spektrum an Partikeldurchmessern in das Plasma transportiert wird. Das Durchmesserspektrum reicht, bei Nutzung der Laser-Ablation als Aufgabesystem, von 10 nm bis mehr als 10 µm [KUHN *et al.* 2005, HINDS 1998].

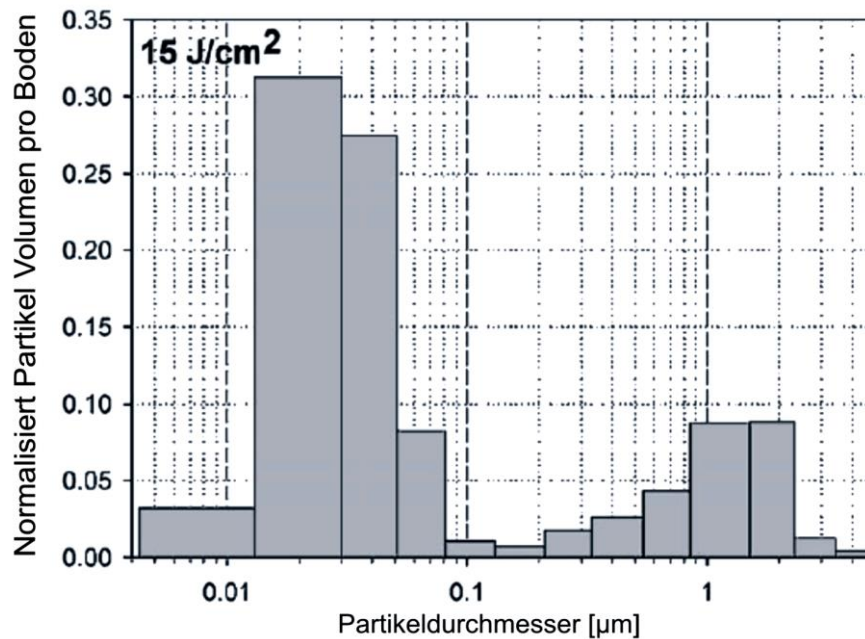


Abbildung 8: Partikelgrößenverteilung eines mittels Laser-Ablation erzeugten Aerosols einer Messingprobe. Für die Generierung wurde ein ArF-Excimer-Laser (193 nm) mit einem Laserstrahldurchmesser von 63 µm, eine Frequenz von 10 Hz und einer Energiedichte von 15 J/cm² verwendet. [KUHN *et al.* 2005]

Durch den stark variierenden Partikeldurchmesser werden die Plasmaprozesse der Verdampfung, Atomisierung und Ionisierung erheblich beeinflusst [RODUSHKIN *et al.* 2002]. Des Weiteren wird die Präzision und Genauigkeit der Analyse signifikant beeinträchtigt, was sich durch eine nicht vollständige Ionisierung der Elemente [PERDIAN *et al.* 2008] und auftretende Fraktionierungseffekte [KUHN *et al.* 2004, KROSLAKOVA UND GÜNTHER 2006, SAETVEIT *et al.* 2008] bemerkbar machen kann. So konnte Guillong zeigen, dass Aerosolpartikel, welche größer als 0,8 µm sind, aufgrund ihrer unvollständigen Verdampfung, Atomisierung und Ionisation einen fraktionierenden Einfluss auf das Analyseergebnis ausüben [GUILLONG *et al.* 2003].

Im Gegensatz zur Flüssigaufgabe, bei der eine Fraktionierung durch die Plasmafackel hervorgerufen werden kann, besteht diese Problematik seitens der Laser-Ablation an drei verschiedenen Stellen der Analyse. So tragen der eigentliche Ablationsprozess, der Aerosoltransport und die Ionisierungsquelle zu einem fraktionierenden Effekt bei [KOCH *et al.* 2002, 2004].

Die Wechselwirkung des Lasers mit der Probe kann aufgrund von unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Probenbestandteile zu einer Ausbildung nicht stöchiometrischer Aerosolpartikel führen. Ein weiterer Fraktionierungseffekt wird durch eine selektive Partikelablagerung infolge von Diffusions- und Gravitationseffekten beschrieben. Die dritte Fraktionierungsquelle stellen Partikel mit einem zu großen Durchmesser dar, wodurch die enthaltenen Elemente unvollständig ionisiert werden.

Um eine Limitation des Analyseverfahrens, die durch die signifikant unterschiedlichen Partikeldurchmesser hervorgerufen wird, zu minimieren, wurden verschiedene Ansätze gewählt.

Durch den Einsatz von Lasern, welche im Nanosekunden- (ns) oder Femtosekundenbereich (fs) gepulst sind, kann das Analyseergebnis erheblich beeinflusst werden. So zeigte Koch [KOCH *et al.* 2004], dass ein fs-Nah-Infrarotlaser ein ultrafeines Aerosol (mittlerer Partikeldurchmesser ≈ 10 nm) erzeugt, welches das Cu/Zn-Verhältnis (Kupfer/Zink) mit einer Abweichung von 3-5 % bestimmt.

Ein ns-Nah-Infrarotlaser produziert zu einem großen Teil Aerosolpartikel im Mikrometerbereich, wodurch ein Teil der Partikel durch Koagulation redepositionieren und das Analyseergebnis nicht repräsentativ für die beprobte Ablationsstelle ist. So konnte Guillong zeigen, dass bei der Verwendung einer kürzeren Laserwellenlänge von 193 nm und daraus resultierenden geringeren Eindringtiefe hauptsächlich Partikel mit einem Durchmesser von < 150 μm erzeugt werden [GUILLONG *et al.* 2003]. Dies führte zu einem stabileren ICP-MS Signal und zur Minimierung des Fraktionierungseffektes. So liegt der Vorteil der kürzeren Wellenlänge in einer erhöhten Sensitivität pro abliertem Volumen.

2.2.4 Quantifizierung mittels LA-ICP-MS

Neben den vielen Alleinstellungsmerkmalen des LA-ICP-MS bei der Charakterisierung von Elementen in biologischen Proben gibt es auch Einschränkungen der Methode. Bis heute ist kein einheitlicher Quantifizierungsansatz entwickelt. Diese Problematik resultiert aus der Tatsache, dass für die unterschiedlichen biologischen Probenmatrizes, hinsichtlich der zu quantifizierenden Elemente oder des gewünschten Konzentrationsbereiches, keine zertifizierten Referenzmaterialien vorhanden sind.

Feldmann [FELDMANN *et al.* 2002] konnte allerdings zeigen, dass der Einsatz einer zertifizierten Schweineleber (LGC 712) möglich ist, musste jedoch das Probenmaterial vorher in eine Scheibenform pressen, um eine einheitliche Oberfläche für die LA-ICP-MS Analyse zu generieren. Außerdem wurde bei dieser Untersuchung lediglich eine Gesamtmetallanalyse mit einer Ein-Schuss-Ablation durchgeführt. In Bezug zur quantitativen orts aufgelösten Analyse stellen die inhomogene Elementverteilung des CRM und die unterschiedlich strukturierten Oberflächen limitierende Faktoren dar. Außerdem kam Jackson zu dem Ergebnis, dass die Proben und die eingesetzten Kalibrationsstandards einen ähnliche Kohlenstoff- und Wassergehalt aufweisen sollten [JACKSON *et al.* 2006].

Ein weiterer Ansatz zur Quantifizierung ist die zusätzliche Aufgabe eines flüssigen Kalibrationsstandards. Hierbei wird dem Plasma des ICP-MS neben dem vom Laser erzeugten Feststoffaerosol ein flüssiger Elementstandard zugeführt. Diese Methode wird mit unterschiedlichen Techniken umgesetzt. So verwendet Boulyga [BOULYGA *et al.* 2004] zur Probenaufgabe einen Ultraschallzerstäuber in der Ablationskammer, während Pickhardt [PICKHARDT *et al.* 2006] den Kalibrationsstandard direkt mit einer Microflow und Becker [BECKER *et al.* 2007] mit einem Ultraschallzerstäuber ins Plasma eintrugen.

Pozebon [POZEBON *et al.* 2010] zeigt einen neuen Ansatz, indem für die beiden Aerosolströme jeweils zwei voneinander getrennte Transportgasströme verwendet und diese erst in der Torch vereinigte. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Ansatzes ist es, dass der flüssige Elementstandard über einen zusätzlich eingesetzten Desolvator getrocknet wird umso die polyatomaren Interferenzen zu minimieren.

Ein Nachteil der flüssigen Kalibrationsaufgabe ist jedoch, dass die Ionisationsbedingungen zwischen einem trockenen und einem feuchten Plasma sehr stark variieren. Dies führt bei gleicher Analytkonzentration zu einer deutlichen größeren Intensität im trockenen Plasma. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass der Ionisationsprozess eines von einer flüssigen Matrix umgebenen Analyten im Gegensatz zu einer festen Matrix ebenfalls Einfluss auf die Ionisationseffizienz besitzt. So zeigt Günther, dass vor dem Einsatz dieser Methode immer eine Analyse zum Intensitätsabgleich durchgeführt werden muss, was eine erheblich Zunahme an Messzeit für variierende Ablationsparameter bedeutet [GÜNTHER *et al.* 1999].

Austin [AUSTIN *et al.* 2010] präsentiert einen Methode, bei der die Probe auf einem mit einer Polyethylenmethacrylat-Schicht (polymethylmethacrylate (PMMA)) überzogen Quarzglassträger positioniert wird. In dieser Schicht befindet sich eine bestimmte Konzentration des Elementes, welches als interner Standard fungiert. Die Kalibration erfolgt durch die Ablation eines mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen versehenen PMMA-Films. Bei der Analyse wird so neben der Probe der PMMA-Film abgetragen, was einerseits die Detektion eines internen Standards ermöglicht und andererseits einen Indikator für den Massetransport zwischen Ablationskammer und dem Plasma des ICP-MS darstellt.

Bei dem am häufigsten gewählten Ansatz, werden sogenannte matrixangepasste Kalibrationsstandards durch die Homogenisierung organischer Materialien mit einer Metallstandardlösung hergestellt. Als Probenmatrix kommen Organgewebe [BECKER *et al.* 2007] oder Polyacrylamidgele [BECKER *et al.* 2004] zum Einsatz.

Der große Vorteil dieses Verfahrens ist, dass der Analyt von einer sehr ähnlichen Matrix wie in der Probe umgeben ist, so dass eine Messwertbeeinflussung durch variierende Ionisationseffizienzen nicht oder nur in geringem Maß vorhanden ist. Ein Vorteil der Polyacrylamidgele ist die technisch gut durchzuführende Homogenisierung der Analytlösung in der Matrix. Während die Homogenisierung bei dem Einsatz von Geweben meist mittels einer Speedmill (Jena Analytik) durchgeführt werden muss, liegt das Acrylamid im flüssigen Aggregatzustand vor, wenn es mit der Analytlösung vermischt wird. Die homogene Verteilung ist für die Quantifizierung mittels LA-ICP-MS von großer Bedeutung [PUGH *et al.* 2011], da Inhomogenität bei einer Linienablation zu einer Zunahme der relativen Standardabweichung und somit zu einer ungenauen Quantifizierung führt.

2.2.5 Datenauswertung der orts aufgelösten Elementdetektion

Die Datenauswertung der orts aufgelösten Elementdetektion stellt in Bezug auf die Erstellung eines Isotopenkontourplots ein großes Problem dar.

Bis heute wird im Gegensatz zu anderen bildgebenden Analysetechniken wie dem MALDI-Imaging oder der Mikro-Röntgenfluoreszenzspektroskopie keine kommerziell erhältliche Software angeboten. Dies führt dazu, dass die Forschungsinstitute intensiv an unterschiedlichen Methoden zur Auswertung der ermittelten Daten arbeiten.

So beschreibt Pozebon [POZEBEN *et al.* 2010], dass die Datensätze der Messungen als Textdatei (txt-Datei) exportiert und anschließend in einem auf Microsoft Excel basierend entwickelten Programm in zweidimensionale Kontourplots umgerechnet werden. Bellis [BELLIS UND SANTAMARIA-FERNANDEZ *et al.* 2010] nutzt einen ähnlichen Ansatz, in dem er die ICP-MS Textdateien mittels eines Visual-Basic-Makros in Microsoft Excel bearbeitet und im Folgenden mittels Origin 5.0 (OriginLab Corporation) zweidimensionale Kontourplots der einzelnen Elemente erstellt.

Giesen [GIESEN *et al.* 2011] verwendet zur Auswertung der LA-ICP-MS Dateien ebenfalls Origin 8.5 (OriginLab Corporation). Am Brainmet Center, welches im Forschungscenter Jülich angesiedelt ist, haben Wissenschaftler um Becker [BECKER *et al.* 2012] erstmals eine eigenständige LA-Software zur Datenauswertung entwickelt. Die Software heißt IMAGENA[®] und berechnet aus den mittels ICP-MS detektierten Intensitäten quantitative Messwerte, welche anschließend mit dem Programm PMOD Version 3.0 (www.pmod.com) visualisiert werden. Diese wird jedoch nicht kommerziell vertrieben und benötigt neben der Software ein weiteres Programm zur Visualisierung.

Im Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen wurde von Müller im Rahmen der Diplomarbeit [MÜLLER 2006] eine Auswerteroutine

basierend auf Microsoft Excel entwickelt. Der Auswerteprozess ist im Folgenden kurz erläutert.

Zu Beginn der Messung wird ein Ablationsraster programmiert, so dass die zu untersuchende Fläche vollständig mit parallel zueinander ausgerichteten Ablationslinien bedeckt ist. Um eine vollständige Probenablation zu gewährleisten, wird der Linienabstand so gewählt, dass die angrenzenden Linien eine Flächenüberschneidung von ungefähr 10 % des Laserstrahldurchmessers aufweisen.

Durch die kontinuierliche Aufnahme der ICP-MS Intensitäten ergibt sich ein eindimensionaler Datensatz aus den ICP-MS Intensitäten (counts per second (cps)) und der Analysenzeit (Sekunden (s)). Im ersten Schritt wird mithilfe eines Isotopenspektrums die Analysenzeit für die Ablation einer Rasterlinie bestimmt (Abbildung 9). Bei Ablationsbeginn ist eine Intensitätszunahme, bei Beendigung eine deutliche Abnahme der ^{13}C -Intensität zu detektieren.

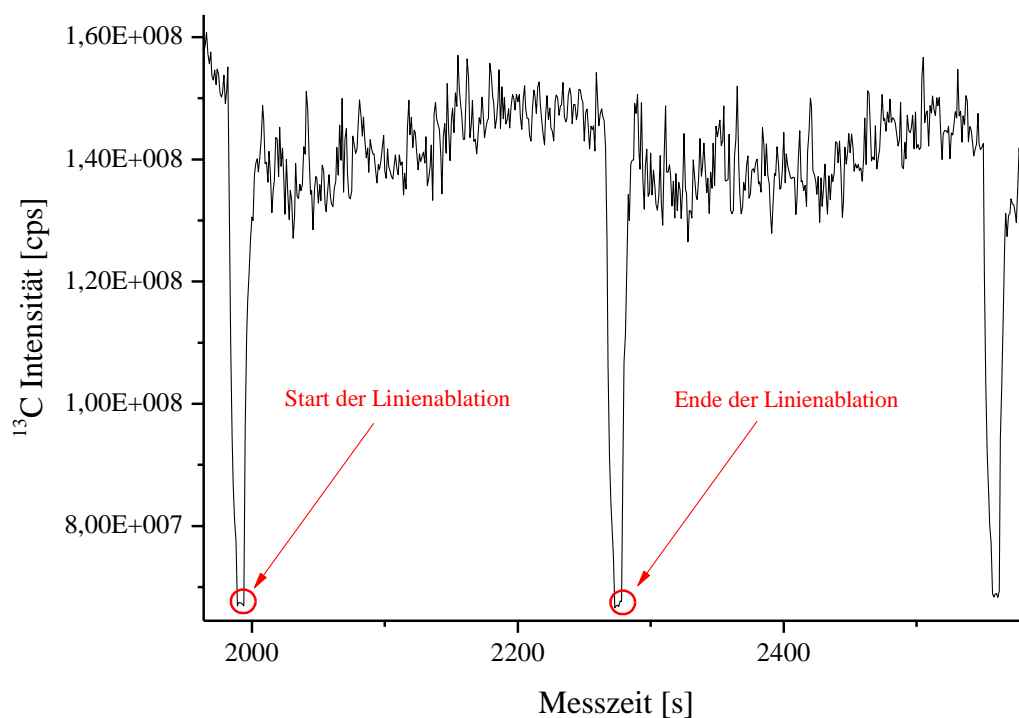


Abbildung 9: Ermittlung des Start- und Endpunktes der Linienablation

Die Differenz der Datenpunkte wird manuell bestimmt und im Folgenden mit der Dauer eines ICP-MS-Messzykluses multipliziert. Anschließend wird durch die bekannte Ablationsgeschwindigkeit des Lasers die Länge der Ablationslinien errechnet, so dass man die y-Komponente für den Kontourplot erhält.

Die ermittelte Anzahl an Datenpunkten pro Ablationslinie wird als konstant betrachtet und der gesamte Datensatz durch diesen Wert dividiert. Die errechneten Teildatensätze werden jetzt einem x-Wert, der sich aus dem bekannten Linienabstand der Ablationsmusters ergibt, zugeordnet. Die zugehörige z-Komponente entspricht den Intensitäten, die für das jeweilige m/Z-Verhältnis detektiert wurden.

2.2.6 Softwareentwicklung

Mit der von Müller [MÜLLER 2005] entwickelten Auswertemethode ergibt sich durch die Division des Gesamtdatensatzes durch die errechnete konstante Anzahl der Datenpunkte pro Ablationslinie ein Problem: Resultierend aus den unterschiedlichen Strömungseigenschaften in der Ablationskammer kann der Fall eintreten, dass für Ablationslinien am Ablationskammerrand eine andere Anzahl von Messpunkten detektiert wird, als für eine Linien in der Ablationskammermitte.

Diese geringe Differenz führt bei einer LA-ICP-MS Messung mit einer Messdauer von einigen Stunden dazu, dass der erzeugte Kontourplot eine Bilddeformation in Form einer Stauchung oder eines Bildversatzes aufweist (Abbildung 10). Mittels dieser Kontourplots ist eine Korrelation zwischen dem Bild der Probe und den Elementabbildungen nicht möglich.

Um dieses Problem gerade in Bezug auf die zu erwartenden langen Analysenzeiten der Mammakarzinomschnitte zu lösen, wurde am Institut für Umweltanalytik im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit [OSSELMANN 2011] eine Auswertesoftware (LA-ICP-MS UniDuE) entwickelt.

Basierend auf dem Softwarepaket LabVIEW der Firma National Instrument wurde eine Programmstruktur für die Datenverarbeitung erstellt und eine grafische Benutzeroberfläche angefertigt.

Das Konzept der Software LabVIEW besteht im Gegensatz zu vielen kommandozeilenbasierten Programmiersprachen aus einer „visuellen Programmierung“, wodurch die Nachverfolgbarkeit und das schnelle Einarbeiten in komplexe Programmierabläufe enorm erleichtert wird.

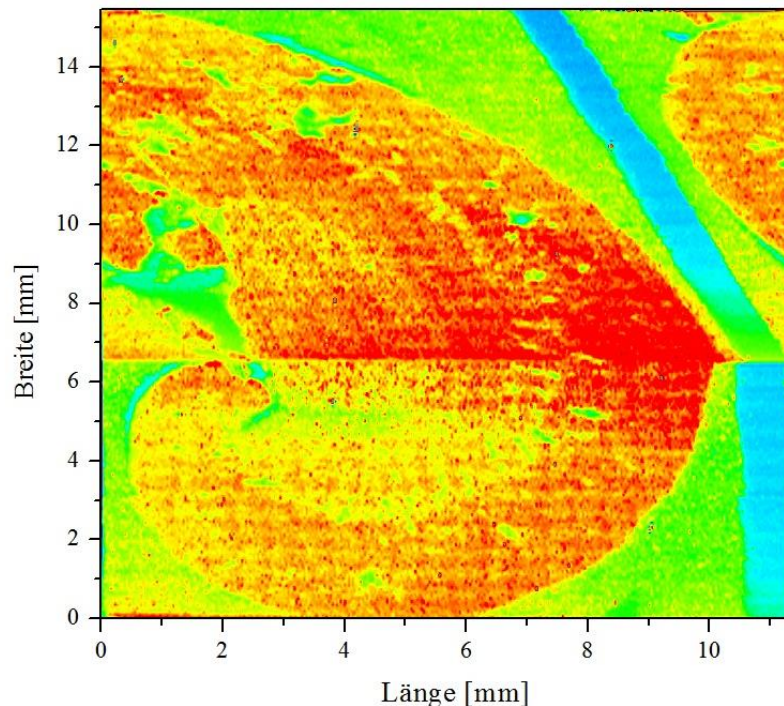


Abbildung 10: LA-ICP-MS Datenauswertung eines Gewebeschnittes mit der von Müller entwickelten Auswertemethode

Der entscheidende und grundlegende Ansatzpunkt des neuen Auswerteverfahrens liegt darin, dass die ermittelten ICP-MS Daten einer Ablationslinie in einer eigenen Datei abgespeichert werden. Die ICP-MS Software wird so programmiert, dass nach einem zeitlich limitierten Zyklus die Messung beendet wird und erst bei einem Remotesignal des Laser Ablationssystems die Messung wieder beginnt. Dadurch kann gewährleistet werden, dass jede Messung die gleiche Anzahl von Messpunkten enthält.

Die Auswertung der Daten verläuft so, dass die Messwerte mittels der ICP-MS Software in einen comma-separated-value Datensatz (csv-Datensatz) transformiert werden. Anschließend werden alle Datensätze aus den ausgewählten Dateien durch LA-ICP-MS UniDuE ausgelesen und importiert. Durch die zusätzliche manuelle Eingabe des Ablationslinienabstandes und dem Verweis auf die Ablationslinienkoordinate, welche ebenso wie die Laserenergie elektronisch gespeichert werden, erstellt die Software eine Datenmatrix aus

Breiten- und Längenangaben und der jeweiligen Signalintensität als z-Komponente.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, steht die Visualisierung der Daten bei der entwickelten Software sehr im Fokus. In den vier Fenstern ist auf der rechten Seite oben eine Kameraaufnahme einer Druckerprobe vor der Ablation und rechts unten eine Aufnahme der ablierten Probe abgebildet. Auf der linken oberen Seite ist ein Konturplot eines Elements abgebildet, während links unten ein Konturplot der Laserenergie dargestellt ist.

Die Abbildungen der verschiedenen m/Z -Verhältnisse können individuell angepasst werden, so dass bereits zu diesem Zeitpunkt eine Analyse der gemessenen Daten durchzuführen ist.

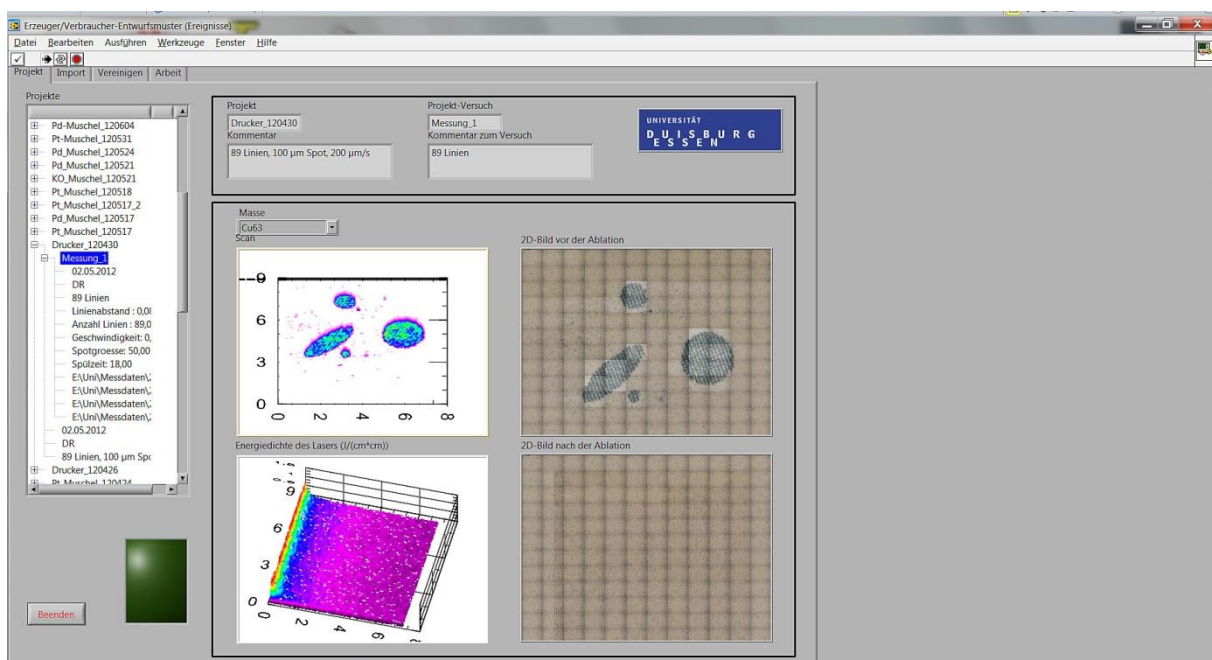


Abbildung 11: Neu entwickelte Auswertesoftware für die LA-ICP-MS. In der Abbildung ist die Auswertung einer Druckerprobe zu sehen.

Für alle weiteren detaillierteren Auswertungsschritte werden die Daten als TDMS-Datei in das Programm Origin 8.5 (Originlab) eingelesen. Hier können neben der Datenvisualisierung auch statistische Berechnungen durchgeführt werden.

Des Weiteren bietet die Software die Möglichkeit, die Daten mehrerer Messtage zu fusionieren. Nachdem die Daten der Linienablationen eines Messtages zusammengerechnet wurden, bietet das Programm die Option, mehrere Messtagsdaten zu einem Gesamtdatensatz zusammen zu fassen. Dies erweist sich bei der Analyse von Gewebeschnitten von Vorteil, da die Messzeit je nach Größe der Probe auch mehr als 20 Stunden betragen kann.

In einer Machbarkeitsstudie wurden mit der LA-ICP-MS Druckerproben untersucht. Hierfür wurden Cellulose Papier mit der Magenta Farbe eines Laserdruckers (Brother 9450 CMD) in einem bestimmten Muster bedruckt und anschließend mit der LA-ICP-MS auf das Element Kupfer untersucht (Abbildung 12). Dieser von Bellis [BELLIS UND SANTAMARIA-FERNANDEZ 2010] etablierte Ansatz ermöglichte die orts aufgelöste Untersuchung an reproduzierbar herzustellenden Proben mit identischer Elementverteilung und -konzentration. Die Untersuchung zeigte, dass die Verzerrung und die hiermit einhergehende fehlerbehaftete Auswertung der Messdaten mit der neu entwickelten Software ausgeschlossen werden. Dies konnte in der Ablation einer Druckerprobe mit einer Messzeit von ungefähr 12 Stunden gezeigt werden.

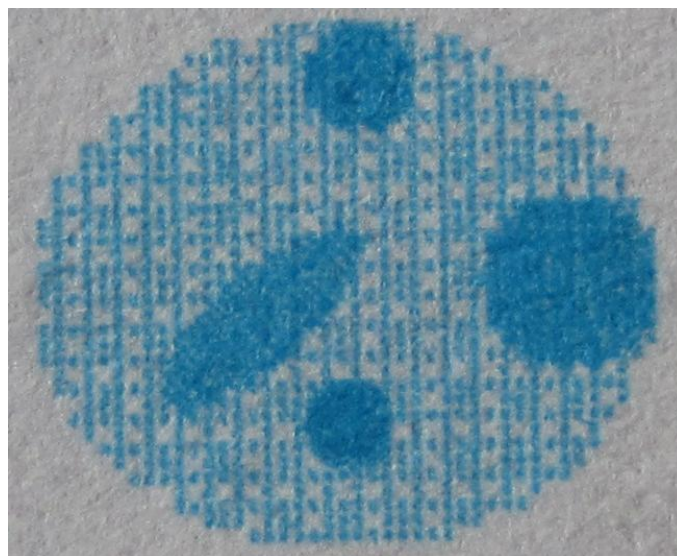


Abbildung 12: Druckerprobe für die Machbarkeitsstudie der Auswertesoftware

Aufgrund der Tatsache, dass es noch keine kommerzielle verfügbare Software-Lösung für die orts aufgelöste Datenauswertung gibt, sind die Benutzer sehr häufig auf kommandozeilenbasierte Auswertungen angewiesen. Dies stellt sich für programmierunerfahrene Nutzer meist als schwierig heraus. Durch die klar strukturierte graphische Benutzeroberfläche (GUI = graphical user interface) ermöglicht die entwickelte Software nach einer kurzen Einarbeitungsphase jedem Nutzer eine einfach und präzise Datenauswertung.

2.2.7 Induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie

Das induktiv-gekoppelte Plasma-Massenspektrometer ist eine universell einsetzbare, nachweisstarke und multielementfähige Methode. Es bietet neben der sehr guten Sensitivität und Genauigkeit der Messergebnisse einen großen linear dynamischen Messbereich und ermöglicht Anwendungen im Spuren- und Ultraspurenbereich. Außerdem ist es als „quasi-simultane“ Methode sehr gut für die Kopplung mit Aufgabetechniken wie der Laser Ablation oder der HPLC (high performance liquid chromatography) geeignet.

Die Probe wird, wenn diese als Flüssigkeit vorliegt, von einer Peristaltikpumpe über den Zerstäuber in die Sprühkammer geleitet. Das vom Zerstäuber erzeugte Probenaerosol wird mittels des Carriergasstroms über das innere von drei konzentrischen Quarzrohren in die Plasmafackel geleitet.

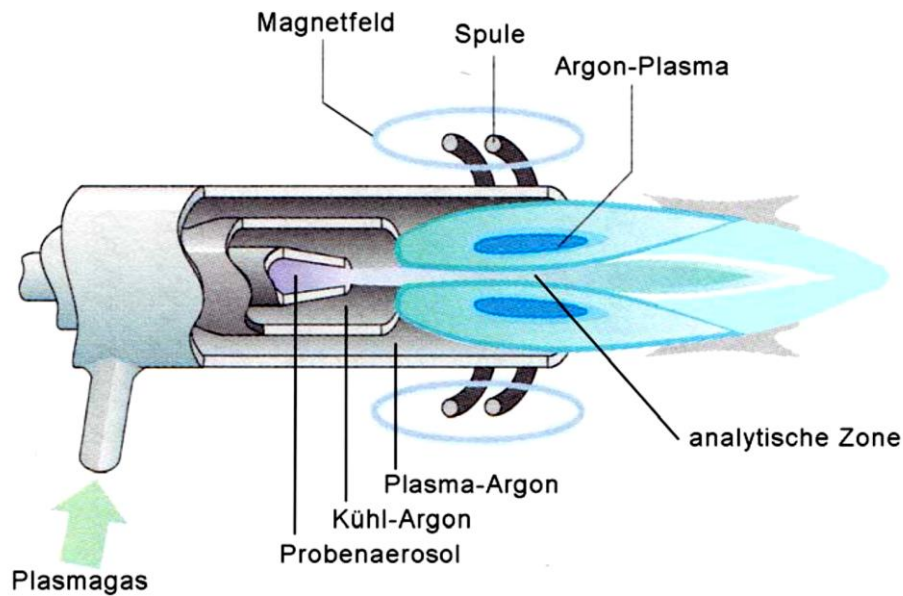


Abbildung 13: Plasmafackel eines ICP-MS [Schwedt 2008]

Im mittleren Rohr strömt das Auxiliarygas, welches die Aufgabe besitzt, durch das Ausbilden eines konstanten Abstands zwischen dem inneren Rohr und dem Plasma eine Überhitzung zu verhindern. Das Plasmagas, welche das Quarzrohr zwischen dem Plasma und Induktionsspule kühlt, wird durch das äußere Rohr geleitet. Durch die mittels Wasser oder Luft gekühlte Spule wird ein hochfrequenter Wechselstrom mit einer Frequenz zwischen 27 MHz und 40 MHz geleitet.

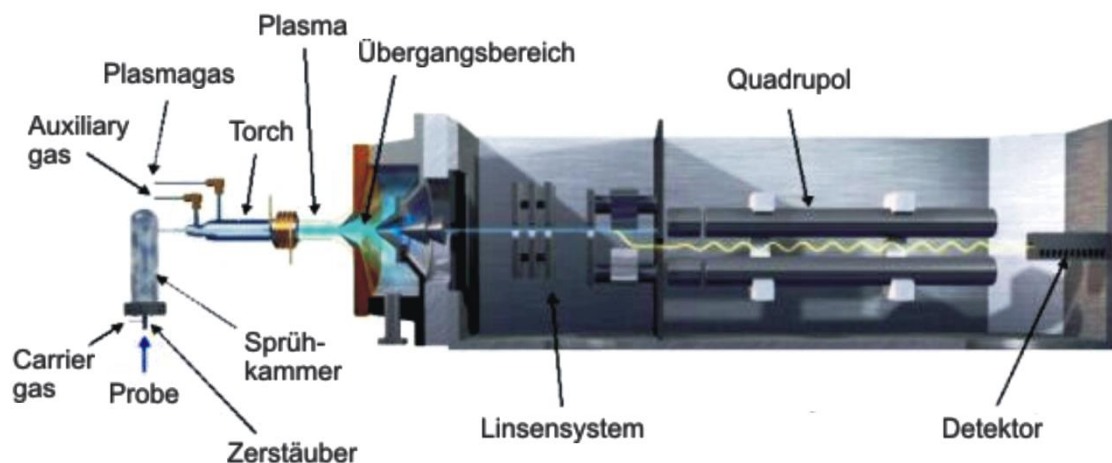
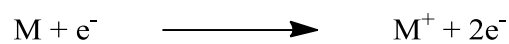


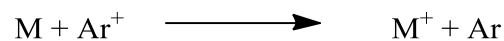
Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer ICP-MS [Agilent Technologies]

Das Plasma entsteht aus der sogenannten induktiven Kopplung des durch den Wechselstrom erzeugten elektromagnetischen Feldes mit den Argonatomen. In der Plasmafackel wird der Analyt bei einer effektiven Temperatur zwischen 6000-8000 °C desolvatisiert, verdampft, atomisiert und ionisiert. Die Ionisierung wird durch die im oszillierenden Feld beschleunigten Elektronen herbeigeführt, welche mit den Atomen oder Molekülen des Analyten kollidieren. Die wichtigsten Ionisationsprozesse des Analyten (M) im Argonplasma sind:

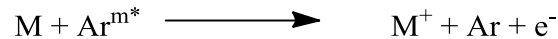
1. Elektronische Ionisation:



2. Die Ionisation durch Ladungstransfer:



3. Chemische Ionisation:



Die positiv geladenen Ionen gelangen von der Plasmafackel direkt in den Interface-Bereich, welcher aus zwei koaxialen, wassergekühlten Blenden besteht, dem Sampler und dem Skimmer Cone (siehe Abbildung 14). Diese stellen den Übergang zwischen den bei atmosphären Druck gebildeten Ionen und dem im Hochvakuumbereich befindenden Massenanalysator dar. Zwischen den beiden Blenden wird durch eine mechanische Pumpe ein Vorvakuum erzeugt.

Anschließend werden die Ionen durch ein Linsensystem geleitet, indem sowohl Neutralteilchen, als auch Photonen aus dem Strahl abgetrennt werden. Im Folgenden wird der Ionenstrahl durch einen Quadrupol-Massenfilter geführt. Hier werden die Ionen nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis (m/Z) aufgetrennt.

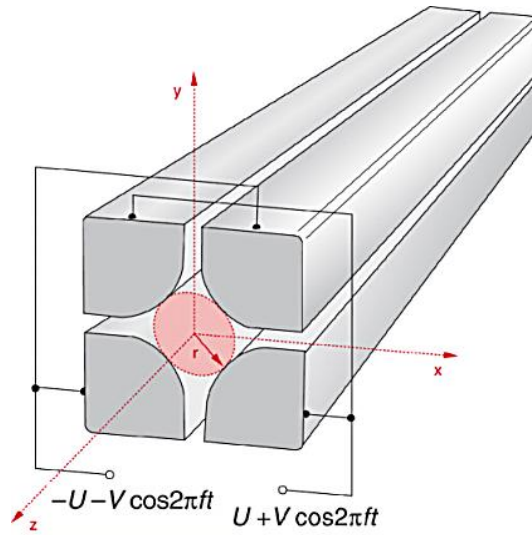


Abbildung 15: Aufbau eines Quadrupolmassenfilters [LOTTSPREICH 2006]

Der Quadrupol besteht aus vier hyperbolischen angeordneten Metallstäben mit einem Radius r . An den gegenüberliegenden Stäben liegen übereinstimmende elektrische Potenziale Φ_0 mit einer Gleichspannung identischer Polarität und eine Wechselspannung in gleicher Phase vor. Das Potenzial gegenüberliegender Stäbe wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Phi(x, y) = \frac{(x^2 - y^2)}{r^2} \Phi_0$$

Formel 1: Berechnung der Potenziale der gegenüberliegenden Stäbe eines Quadrupols

mit x, y als Abstand von der Längsachse, r als Abstand von der Längsachse zu den Elektroden und Φ_0 als an die Elektrode angelegtes Potenzial.

Damit kann die Kraft beschrieben werden, welche auf die sich in z -Richtung, entlang der Elektroden fortbewegenden Ionen bei gegebenem Potenzial wirkt:

$$F_x = -e \frac{2x}{r^2} \Phi_0$$

Formel 2: Berechnung der auf ein Ion wirkenden Kräfte

mit e = Elementarladung. Die Kraft steigt von null linear von der Längsachse des Quadrupols an. Die Bewegung der Ionen kann durch die Mathieuschen Differenzialgleichungen beschrieben werden. Durch die Lösung dieser komplizierten Gleichungen können Ionenbahnen als stabil oder instabil klassifiziert werden. Solche, welche sich auf einer stabilen Bahn bewegen, passieren den Quadrupol und können anschließend detektiert werden. Alle Ionen, welche sich auf instabilen Bahnen bewegen, werden herausgefiltert. Aufgrund der Tatsache, dass die Potenzialänderungen sehr schnell vollzogen werden können (1 ms), wird das qICP-MS als quasi-simultaner Massendetektor betrachtet. Abschließend werden die Ionen in einem Detektorsystem, das sowohl zur Detektion einzelner durch auftreffende Ionen ausgelöster Ereignisse (Puls-Modus), als auch zur Messung eines durch das Auftreffen vieler Ionen ausgelösten Stromes (Analog-Modus) geeignet ist.

Die Eigenschaft eines Massenspektrometers, unterschiedliche Massen auch als zwei verschiedene Signale zu detektieren, wird durch die Massenauflösung R bestimmt:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Formel 3: Berechnung der Massenauflösung

mit m = detektierte Masse und Δm = Massendifferenz zweier Ionen. Nach der 10 %-Tal-Definition werden zwei Massen m und $m + \Delta m$ als getrennt betrachtet, wenn der Schnittpunkt der beiden gleich hohen Signale kleiner als 10 % der maximalen Peakhöhe beträgt [BECKER 2007]. Die Massenauflösung variiert bei unterschiedlichen massenspektrometrischen Systemen zum Teil erheblich. So erzielt man mit einem doppeltfokussierenden Sektorfeldgerät eine Massenauflösung von bis zu 20000, während diese bei einem Quadrupolgerät mit < 400 beziffert wird [BECKER 2007].

2.2.8 Ortsaufgelöste Röntgenfluoreszenzanalyse

Die ortsaufgelöste Röntgenfluoreszenzanalyse ist eine zerstörungsfreie multielementfähige Messmethode, mit einer lateralen Auflösung von einigen 10 μm . Das Analyseprinzip beruht auf der Anregung von Elektronen durch die Absorption von Röntgenstrahlen. Durch die Wechselwirkung zwischen einem Elektron und der elektromagnetischen Strahlung wird dieses entweder in ein höheres Energieniveau angehoben oder verlässt bei ausreichend großer Energie das Atom. In diesem Fall muss die übertragene Energie größer als die Bindungsenergie des Elektrons sein.

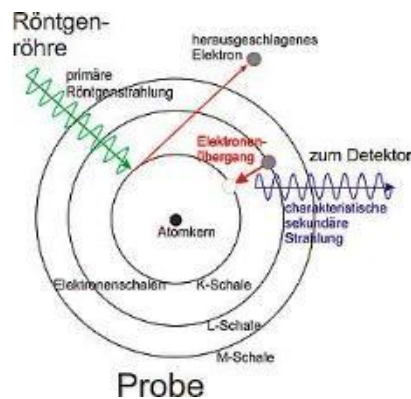


Abbildung 16: Anregung eines kernnahen Elektrons durch die Wechselwirkung mit der Röntgenstrahlung [Quelle: Fachhochschule Nürnberg, Fakultät Werkstofftechnik, 2012]

Durch diesen Vorgang entsteht ein hochenergetisch angeregtes Kation, welches seinerseits durch den Übergang eines Elektrons einer höheren Schale in die entstandene Lücke in einen energetisch niedrigeren Zustand übergehen kann (Abbildung 16). Die Energiedifferenz der beiden Zustände wird als Röntgenquant emittiert. Diese Röntgenstrahlung wird aufgrund der für jedes Element spezifischen Energieniveaudifferenzen als charakteristische Röntgenstrahlung bezeichnet und dient zur Identifizierung der untersuchten Probe. Aufgrund der Proportionalität zwischen der Intensität der emittierten

Strahlung und der Anzahl der Atome im Informationsvolumen kann mit dieser Methode auch Quantifiziert werden.

Zur Bündelung der primären Röntgenstrahlung wird als sogenannte Röntgenoptik (Abbildung 17) eine Polykapillare-Optik eingesetzt, welche aus in einem monolithischen Glaskörper zusammengefassten Glaskapillaren besteht. Die Eingangsseite der Kapillaren sind auf die Röntgenröhre gerichtet, während die Ausgangsseite auf einen Punkt fokussiert ist.

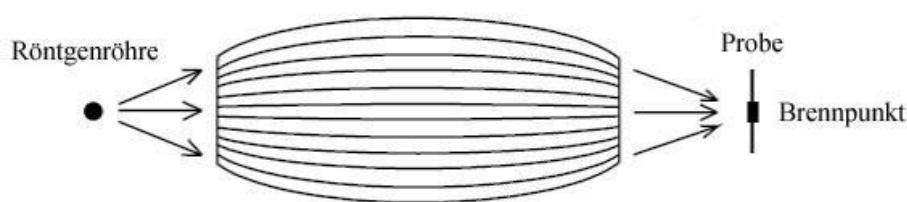


Abbildung 17: Polykapillare Optik zur Fokussierung der Röntgenstrahlen¹

Durch die Unterschreitung des kritischen Winkels wird die einfallende elektromagnetische Strahlung an den Grenzflächen nahezu verlustfrei reflektiert. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Totalreflexion [BECKHOFF 2006]. Die Detektion der emittierten charakteristischen Röntgenstrahlung erfolgt anschließend auf einem Siliciumdriftdetektor (SSD=silicon drift detector), welcher aus einem Peltier-gekühlten Siliciumwafer besteht. Durch den Eintritt der Strahlen in den Silicium-Einkristall werden Elektronen-Loch-Paare erzeugt, deren Anzahl eine Proportionalität zur Energie des einfallenden Röntgenquants aufweist. Mittels der am Kristall anliegenden Spannung können die vom Valenzband ins Leitungsband promovierten Elektronen zur Anode bewegt werden, bevor diese mit den Elektronenlöchern wieder rekombinieren. Durch einen äußeren Widerstand kann ein Spannungsimpuls detektiert werden, dessen Höhe wie die Anzahl der Elektronen-Loch-Paare proportional zu der Energie der einfallenden Röntgenquanten ist.

¹ B. Beckhoff, *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*, Springer Verlag, Berlin, 2006

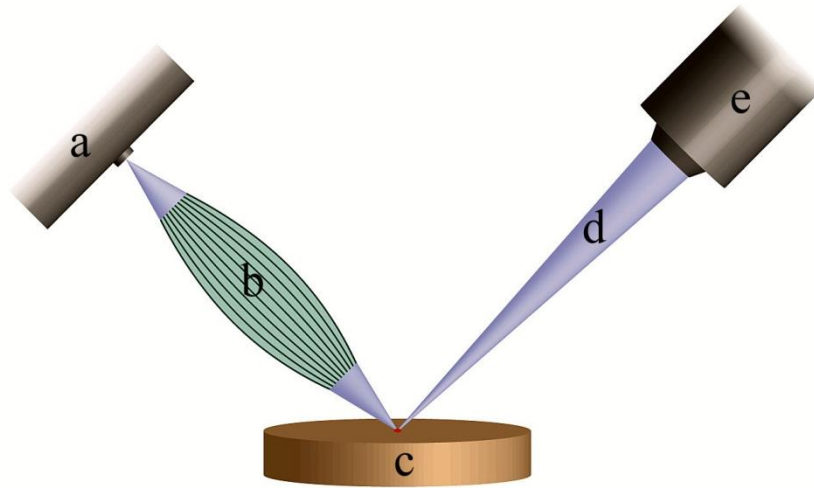


Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer μ -RFA. a) Röntgenröhre; b) Polykapillare; c) Probentisch mit Probe; d) Fluoreszenzstrahlung; e) Detektor [Quelle: Bruker Nano Berlin, 2012]

3. Methoden

3.1 Chemikalien und Gase

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Gase

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid; N,N'-Methylenbisacrylamid 37.5:1	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-(hydroxamethyl)-aminomethan	≥ 99,9 % Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	≥ 99,5 % Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	≥ 99,5 % Acros, New Jersey, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	≥ 98,0 % Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	≥ 99,0 % Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol p.a.	≥ 99,8 % VWR-International, Darmstadt, Deutschland
Wasser	Reinstwasser, Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Kryogewebekleber	Tisseu-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Zn ICP-MS Standard	Acros Organics, New Jersey, USA
Helium 5.0	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Argon 4.6	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland

3.2 Labor-, Analysengeräte und Zubehör

Tabelle 4: Verwendete Labor-, Analysengeräte und Zubehör

Laborgeräte	Bezeichnung
Ultraschallbad	USC 600 T, VWR International, Leuven
Laminar Flow Box	Laminar-Flow Box FBS, Spetec
Analysenwaage Satorius MP 61	Gönten Wägetechnik, Bot-Kirchhellen, Deutschland
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Transferpipetten	Finnpipetten® 2-10 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, Thermo Scientific, Langenselbold
pH-Meter	pH 211 Mikroprozessor Hanna Instruments
Laserdrucker	Brother MFC-9450 CDN, Brother International GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
Laser Ablation	UP 213 FP, New Wave Research, ESI Inc., Fremont , CA, USA
ICP-MS	ICP-MS 7500 a, Agilent Technologies, Yokogawa, Japan
Doppelseitiges Klebeband	Tesa, Beidersdorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger (75×25×1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Mikrotomklebeband für die Gewebeschnitte	Scotch® Klebeband 821, 3M Neuss Deutschland

Laborgeräte	Bezeichnung
Mikrotom	Leica CM 1900 Kryostat/Mikrotom, Leica Biosysteme GmbH, Nussloch, Deutschland
Durchflussregler für He	MV-394-He, Bronkhorst Mattig GmbH, Kamen, Deutschland
Mikro-Röntgenfluoreszenzspektroskop	M4 Tornado, Bruker Nano, Berlin
Labview	Labview®, National Instruments, München, Deutschland
Gelgießstand	Höfer SE 260, Serva Elektrophorese, Heidelberg, Deutschland
Zertifiziertes Referenzglas NIST 612	National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MA, USA
Zertifiziertes Referenzglas NIST 610	National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MA, USA
Mikroliterzentrifuge	Eppendorf Minispin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.3 Ortsaufgelöste Elementdetektion mittels LA-ICP-MS

Für die ortsaufgelöste Elementdetektion an Mammakarzinomen wurde ein LA-ICP-MS mit einer Kryoablationskammer eingesetzt. Das Flüssigaufgabesystem bestehend aus Peristaltikpumpe, Zerstäuber und Sprühkammer wird bei der Kopplung der Laserablationseinheit mit dem ICP-MS nicht genutzt.

Für die Konnektion der Probeaufgabe mit dem Detektor wurde eine 50 cm lange flexible Transferleitung zwischen dem Ausgang der Ablationskammer und der Torch des ICP-MS eingesetzt. Zusätzlich wurde, 10 cm nach dem Ablationskammerausgang, in die Transferleitung mittels eines Y-

Transferstückes ein Argon Ablationsgasstrom eingeleitet. Des Weiteren wurde 30 cm nach dem Ablationskammerausgang ein 3-Wege-Ventil eingebaut, welches die Möglichkeit bietet, einen Probenwechsel im ICP-MS Messbetrieb durchzuführen. Während dieses Prozesses strömt der Ablationsgasstrom in die Abluftleitung, so dass die Öffnung der Ablationskammer und der damit verbundene Luftsauerstoffeintritt nicht zu einer Elimination des Plasma führt. Die Gaszuführungen der Sprühkammer am ICP-MS wurden so verwendet, dass der Carriergasstrom an das Y-Stück der Transferleitung angeschlossen wurde, während der Make Up-Gasstrom in die Kammer zwischen Laserstrahlausstritt und dem aus Glas bestehenden oberen Abschluss der Ablationskammer eingeleitet wurde.

Da die Ablationskammer mittels des eingebauten Peltier-Moduls auf eine Temperatur von -20°C gekühlt werden kann, kondensiert an der Außenwand der Glasscheibe während einer Messung Wasser aus der Umgebungsluft. Durch den konstanten Argonstrom wird dies unterbunden. Der zusätzlich aufgegebene Volumenstrom am Y-Stück der Transferleitung führt zu deutlich verbesserten Transporteigenschaften des Probenaaerosols zum Plasma [BLEINER *et al.* 2006].

3.3.1 Tuning der LA-ICP-MS

Vor jeder Messung wird das LA-ICP-MS auf maximale Intensität und möglichst geringe isobare und polyatomare Interferenzen eingestellt. Hierzu wurde ein zertifiziertes Referenzglas (NIST 612, CRM) eingesetzt, dem 61 Elemente mit einer Konzentration von 50 mg/kg zugefügt sind.

Zu Beginn wurde der Laser auf konstant verwendete Tuningparameter eingestellt, um eine Vergleichbarkeit der Messzustände zu gewährleisten (Tabelle 5). Vor jeder Messung wurde der Laser auf die Tuningbedingungen eingestellt und bei geschlossenem Shutter, einer mit einem Spiegel besetzten

Abtrennung zwischen dem Laserstrahlausgang und der Ablationskammer, für 60 Minuten betrieben. Dies dient zur Temperierung des Festkörperlasermediums, damit Leistungsschwankungen während der Messung ausgeschlossen werden können [Riesop 2008]. Außerdem wurde während dieser Zeit das gesamte Messsystem mit dem Ablationsgas Helium gespült.

Tabelle 5: Laserparameter zur Einstellung der maximalen Sensitivität

Messparameter	Wert
Laserstrahldurchmesser [μm]	100
Energie [mJ]	$\sim 0,1$
Energiedichte [J/cm^2]	$\sim 2,0$
Laseroutput [%]	75
Ablationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]	30
Frequenz [Hz]	10
He-Ablationsgasstrom [l/min]	1.3

Das zertifizierte Referenzglas wurde in der Ablationskammer positioniert und der Laserstrahl mittels der Laser-Software auf die Glasoberfläche fokussiert. Anschließend wurden Start- und Endposition einprogrammiert, welche so gewählt werden, dass die Ablation am Ablationsgaseingang startet und am Ablationskammerausgang endet. Unter der Annahme, dass der Ablationsgasstrom ein laminares Strömungsprofil aufweist, vollzieht der Laser eine hierzu parallel ausgerichtete Linie. Die Ergebnisse von Venkatachalam [VENKATACHALAM *et al.* 2007] zeigen, dass es bei entgegengesetzter Ablationsrichtung zu erheblichen Intensitätsschwankung kommt.

Für die Intensitätseinstellungen wurden die Isotope ^{11}B (Bor), ^{88}Sr (Strontium), und ^{238}U (Uran) verwendet, um in einem möglichst großen Massenbereich eine optimale Messeinstellung zu gewährleisten.

Zur Interferenzminimierung wird die Oxidbildungsrate über das Verhältnis von m/Z 248 / m/Z 232 (Thoriumoxid (ThO) / Thorium (Th)) bestimmt, während die Bildungsrate an doppeltgeladene Ionen anhand des Verhältnisses m/Z 70 zu m/Z 140 (Ce, Ce^+/Ce^{2+}) überprüft wurde.

Nach dem Tunning ergab sich eine relative Standardabweichung der angegebenen Isotope von 2-6 %. Die Oxidbildungsrate und die Bildung doppelt geladener Ionen lagen bei Werten von kleiner als 1 %.

Die Überprüfung der P/A-Faktoren erfolgt mittels des zertifizierten Referenzglases NIST 610, welches ebenfalls 61 Elemente aufweist, diese jedoch in einer nominalen Konzentration von 500 mg/kg vorhanden sind. Die Software des ICP-MS besitzt für diese Bestimmung eine vom Hersteller festgelegte Methode, in der vom Benutzer die zu vermessenden Isotope eingetragen werden. Diese sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Verwendete Isotopen im CRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren

Element	m/Z	Element	m/Z
Li	7	Sr	88
Ne	20	In	115
Mg	24	Ta	181
K	39	Bi	209
Mn	55	U	238
Ga	69		

3.3.2 Methodenoptimierung der LA-ICP-MS

Biologische Proben mit einer bekannten lateralen Elementverteilung und bekannter Elementkonzentrationsangabe sind nicht verfügbar, so dass eine Methodenoptimierung für die orts aufgelöste Elementanalytik aufgrund von geeigneten Probenmaterials erschwert ist. Ein Lösungsansatz, welcher sich durch eine gute Reproduzierbarkeit und einfache Herstellung auszeichnet, wurde

2010 von Bellis [BELLIS UND SANTAMARIA-FERNANDEZ 2010] veröffentlicht. Er beschreibt den Einsatz eines Druckmusters, welches auf ein Cellulosepapier aufgetragen wird. Durch die Verwendung eines festgelegten Musters ist die Elementverteilung bekannt, außerdem lassen sich über die Einstellung der Farbtransparenz unterschiedliche Elementkonzentrationen simulieren.

Dieser Ansatz wird zur Methodenoptimierung für die Analyse der Gewebeschnitte adaptiert. Die Hauptkriterien für diese Entscheidung liegen in der bekannten lokalen Elementverteilung, der Verwendung eines Analyten mit ähnlicher Elementmasse und erste Ionisierungsenergie wie das Element Zink und außerdem einer kohlenstoffreichen Probenmatrix. Somit werden sowohl Ablations- als auch ICP-MS-spezifische Analyseigenschaften adressiert.



Abbildung 19: Druckmuster zur Methodenoptimierung des LA-ICP-MS

Das in Abbildung 19 abgebildete Muster wurde für die Methodenoptimierung verwendet. Die Vorlage wurde mit Microsoft PowerPoint 2010 angefertigt und enthält in dem äußeren Kreis neun Objekte, welche alle mit einer Deckkraft von 100 % mit einem Laserdrucker in der Farbe Cyan Blau gedruckt wurden. Die Dimensionen der Objekte kann in der Software in metrischer Skalierung eingegeben werden (Tabelle 7). Der Druck erfolgte mit einer Druckeinstellung von 2400 dpi (dots per inch).

Nachdem die Druckvorlage fertiggestellt war, wurde diese mittels einer Keramikscher in rechteckiger Form aus dem DIN-A4 Blatt ausgeschnitten.

Diese und alle folgenden Arbeiten wurden in der Flowbox durchgeführt, um partikuläre Kontaminationen zu vermeiden. Im Folgenden wurde ein Objektträger mit einem Glasschneider von seiner Ausgangslänge 75 mm auf eine Länge von 40 mm gekürzt, um diesen der äußeren Abmessung der Ablationskammer (45 mm × 45 mm) anzupassen. Auf eine Seite des Glasobjektträgers wurde über die gesamte Fläche doppelseitiges Klebeband fixiert. Abschließend wurde die Druckerprobe mittig auf dem Klebeband platziert und in eine Aufbewahrungsbox gelegt.

Tabelle 7: Druckermuster zur Methodenoptimierung der LA-ICP-MS

Objektform	Länge, Breite [cm]	Anzahl	Deckkraft [%]
Kreis	0,01; 0,01	2	100
Kreis	0,02; 0,02	3	100
Kreis	0,05; 0,05	1	100
Kreis	0,1; 0,1	1	100
Kreis	0,2; 0,2	1	100
Ellipse	0,3; 0,1	1	100
Kreis	0,7; 0,7	1	100

Im nächsten Schritt wurde die LA-ICP-MS wie in 3.3.1 beschrieben für die Analyse vorbereitet. Durch Literaturvergleiche mit Arbeiten, in denen die LA-ICP-MS ebenfalls für die Analysen von Gewebeschnitten eingesetzt wurde [POZEBON *et al.* 2010; KAMALY *et al.* 2010], und mathematischen Berechnungen bezüglich der durchschnittlichen Probengröße und daraus resultierender Messdauer wurden Parameter für die Methodenentwicklung festgelegt.

Dabei handelt es sich um die Messzeit pro m/Z Verhältnis (integration time), um die Ablationsgeschwindigkeit, mit der der Laser über die Probe fährt, sowie den Durchmesser des Laserstrahls. In der nachstehenden Tabelle sind die verwendeten Einstellungsvariationen aufgelistet.

Tabelle 8: Parameter zur Methodenoptimierung des LA-ICP-MS

Messzeit pro m/Z [s]	Ablationsgeschwindigkeit [µm/s]	Laserstrahldurchmesser [µm]
0,05	50	200
0,1	50	200
0,1	30	200
0,1	50	200
0,1	100	200
0,1	50	125
0,1	50	200

Die Druckerproben wurden in der Kryoablationskammer in einer speziell angefertigten Aluminiumvorrichtung fixiert. Diese Vorrichtung lässt sich über eine Aussparung in der Ablationskammer fixieren, so dass eine nahezu identische Positionierung der Probe auch nach einer Entnahme aus der Ablationskammer gewährleistet werden kann. Dies wurde eingesetzt, wenn die Analysenzeit mehr als 12 Stunden betrug. Eine identische Positionierung des einprogrammierten Ablationsrasters, welche manuell in der Mikrometerskalierung nicht möglich ist, wird durch eine Funktion in der Herstellersoftware ermöglicht.

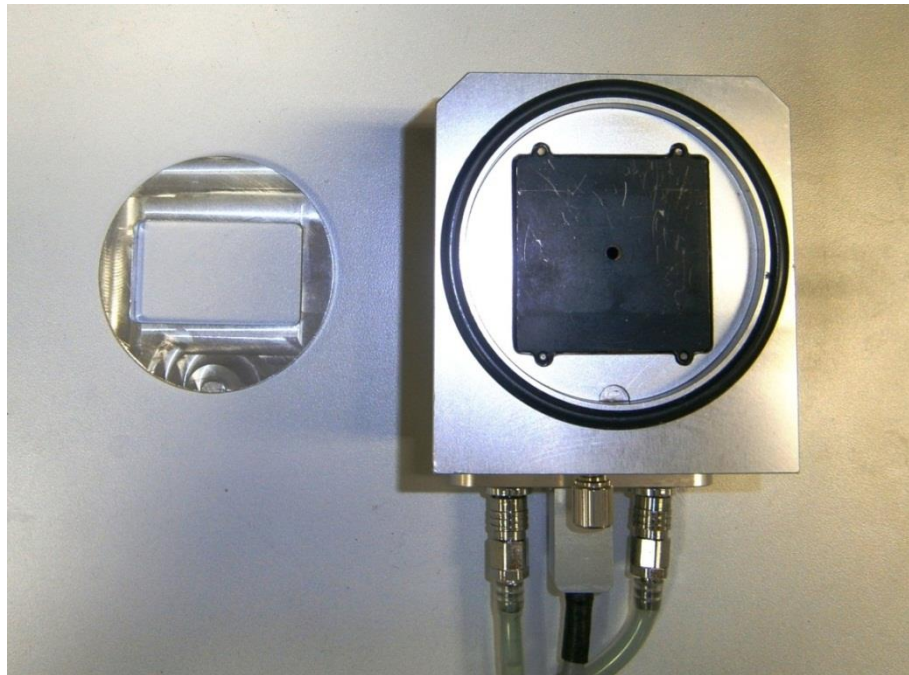


Abbildung 20: Kryoablationskammer mit einem fixierbaren Aluminiumeinsatz des LA-ICP-MS Systems

Für die Methodenoptimierung wird sowohl die Aluminiumvorrichtung genutzt, als auch die Temperatur der Ablationskammer mittels eingebauten Peltierelements auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, so dass die gleichen Bedingungen wie bei der Analyse der Gewebeschnitte simuliert werden.

Anschließend wird das Ablationsraster wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit dem Startpunkt am Ablationskammereingang und Endpunkt am Ablationskammerausgang einprogrammiert. Für die anschließende Auswertung wird die Software so eingestellt, dass sowohl die Koordinaten der Ablationslinien, die Laserenergie als auch eine photographische Aufnahme der Probe vor und nach der Ablation abgespeichert werden. Die verwendeten LA-ICP-MS Parameter sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: LA-ICP-MS Messparameter zur Methodenoptimierung

LA-ICP-MS Messparameter	
Rf-Power [W]	1550
Flussrate Plasmagas [L/min] (Ar)	15
Flussrate Trägergas [L/min] (Ar)	1.1
Scan modus	Peak hopping
Messzeit pro m/Z [s]	0,05 / 0,1
Laserstrahldurchmesser [μm]	100 / 125 / 200
Ablationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	30 / 50 / 100
Isotope	^{13}C , ^{31}P , ^{34}S , ^{54}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{129}Xe
Flussrate Ablationsgas [L/min] (He)	1,3
Frequenz [Hz]	20
Energiedichte [mJ/cm^2]	0,8
Aufwärmzeit des Lasers [s]	5
Auswaschzeit nach Linienablation [s]	18

Während der Methodenoptimierung werden zur besseren Vergleichbarkeit dieselben Isotope wie bei der anschließenden Analyse der Gewebeschnitte detektiert. Neben den Element Eisen (Fe), Kupfer (Cu) und Zink (Zn) wurde das ^{13}C -Isotop des Kohlenstoffs als „Quasi-Interner-Standard“ mit gemessen. Durch den großen Massenanteil dieses Elementes in der Probe kann mittels des Kohlenstoffsignals eine Aussage über den Aerosoltransport, sowie die Schichtdicke der Probe [HARE *et al.* 2011] getroffen werden.

Das Element Xenon ist eine Verunreinigung aus dem Herstellungsprozess des Argons und wird als Indikator für Ionisationsschwankungen im Plasma verwendet.

3.3.3 Quantifizierung der LA-ICP-MS

Für die Quantifizierung der Mammakarzinome wird die Methode der matrixangepassten Kalibration eingesetzt (Kapitel 2.2.4, S.33). Als Matrix wird ein 12,5 % iges Polyacrylamidgel verwendet, welches vor der Polymerisationsreaktion mit dem berechneten Volumen an ICP-MS Kalibrationsstandard versetzt wurde. Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden aufgrund des Ausschlusses von partikulären Verunreinigungen unter der Flowbox durchgeführt.

Zu Beginn wurden in einem 10 ml Greiner-Probengefäß 6 ml Acrylamidlösung angesetzt. Hierzu wurden 2,5 ml N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1), 1,5 ml Tris-(hydroxamethyl)-aminomethan (0,5 M) und 1,9 ml Reinstwasser homogenisiert. Eine 10 % ige Ammoniumperoxosulfat-Lösung (APS) wurde vor der Polymerisationsreaktion durch das Lösen von 0,1 g APS in 1 mL Reinstwasser hergestellt. Ebenfalls direkt vor der Verwendung wurde eine 10 % ige Tetramethylethyldiamin-Lösung (TEMED) durch die Zugabe von 0,25 ml TEMED-Lösung und 2,25 ml Reinstwasser angesetzt.

Für die Herstellung des Kalibrationsstandards wird eine ICP-MS Standardlösung mit einer Konzentration von 1 g/kg verwendet, aus der zwei Standardlösungen mit Konzentrationen von 1 mg/kg und 10 mg/kg hergestellt wurden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Volumina der unterschiedlichen Lösungen aufgeführt, welche mittels einer Waage gegenkontrolliert wurden.

Tabelle 10: Herstellung der Kalibrationsstandards

Konzentration [mg/kg]	ICP-MS Standard [mg/kg]	V (ICP-MS Standard) [µl]	V (12.5 % Acrylamid- Lösung) [µl]	V (APS, 10 %) [µl]	V (TEMED, 10 %) [µl]
0,05	1	50	925	20	5
0,5	10	50	925	20	5
1	10	100	875	20	5
10	1000	10	965	20	5
50	1000	50	925	20	5

Die einzelnen Kalibrationsstandards wurden jeweils in einem 1 ml Eppendorf-Gefäß angesetzt und bevor die Zugabe des APS und des TEMED erfolgte für 5 Minuten auf einer Eppifuge homogenisiert.

Anschließend wurde nacheinander in jedes Gefäß die in Tabelle 10 aufgelisteten Volumina der Radikalstarter für die Polymerisationsreaktion gegeben. Nach einer 1 minütigen Homogenisierung auf der Eppifuge, wird die gesamte Lösung in ein gereinigtes Gewebeschälchen (Cryomold; 10 mm × 10 mm × 5 mm) gegeben. Nach 15 Minuten war der matrixangepasste Kalibrationsstandard fest und wurde im Folgenden auf einen mittels flüssigen Stickstoffs gekühlten Aluminiumblock gestellt.

Im letzten Fertigungsschritt wurde der gefrorene Standard mit einem Kryomikrotom bei – 20 °C in Proben mit einer Schichtdicken von 10 µm geschnitten. Hierzu wurde dieser aus dem Gewebeschälchen herausgelöst und mit einem speziellen Klebstoff (Tissue Tek®, O.C.T) auf den Probenhalter des Mikrotoms fixiert. Die ersten 20-30 abgehobelten Probenschnitte werden verworfen um eventuell vorhandene Kontaminationen auf der Oberfläche der Probe zu entfernen. Folgende Einstellungen des Mikrotoms wurden hierfür verwendet.

Tabelle 11: Parameter des Kryomikrotoms zur Herstellung von Gel- und Gewebeschnitten

Klingentemperatur	-22 °C
Probentischtemperatur	-20 °C
Umgebungstemperatur	-20 °C
Klingenmaterial	Kohlenstoffstahl

Durch die Verwendung eines Klebebandes (Scotch® Klebeband 821, 3M) wurde ein Zerbrechen der Probe aufgrund des hohen Wassergehaltes verhindert [URGAST *et al.* 2012]. Das Klebeband wurde mit einer Keramikscher in eine annähernd gleiche Dimension wie der Grundfläche des Kalibrationsstandards geschnitten und kurz vor dem Schneiden aufgetragen. Der angefertigte Acrylamidschnitt war auf dem Klebeband fixiert, wodurch die Herstellung einer gleichmäßig geschnittenen Probe gesichert werden konnte. Ohne das Klebeband kam es häufig aufgrund der großen Scherkräfte zur Komprimierung des Probenschnittes, wodurch eine ungleichmäßige Schichtdicke resultierte. Dies führt zu einer ungenauen und fehlerbehafteten Kalibration.

Der auf dem Klebstoff haftende Standard wird anschließend auf einem mit doppelseitigem Klebeband überzogenen Objektträger fixiert und in eine Aufbewahrungsbox auf dem Stickstoff gekühlten Aluminiumblock gelegt.

Das LA-ICP-MS wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben vollständig mit Helium gespült und auf maximale Intensität eingestellt. Die Kryoablationskammer wurde auf -15°C temperiert, so dass die Proben in gefrorenen Zustand abliert wurden. Für die Quantifizierung wurde eine Linienablation mit Startpunkt am Ablationskammereingang in Richtung zum Ablationskammerausgang vermessen. Die LA-ICP-MS Messparameter sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: LA-ICP-MS Messparameter zur Elementquantifizierung

LA-ICP-MS Messparameter	
Rf-Power [W]	1550
Flussrate Plasmagas [L/min] (Ar)	15
Flussrate Trägergas [L/min] (Ar)	1,1
Scan modus	Peak hopping
Messzeit pro m/Z [s]	0,1
Laserstrahldurchmesser [μm]	200
Ablationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	50
Isotope	^{13}C , ^{31}P , ^{34}S , ^{54}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{129}Xe
Flussrate Ablationsgas [L/min] (He)	1,3
Frequenz [Hz]	20
Energiedichte [mJ/cm^2]	0,8
Aufwärmzeit des Lasers [s]	20
Auswaschzeit nach Linienablation [s]	10

Für die Quantifizierung wurden dieselben Messparameter wie bei der Analyse der Mammakarzinomschnitte verwendet. Hiermit war sowohl seitens des Ablationsprozesses als auch der Detektion in der ICP-MS die bestmögliche Vergleichbarkeit hergestellt.

3.3.4 Ortsaufgelöste Elementanalytik von Gewebeschnitten mittels LA-ICP-MS

Vor dem Start der Analyse wurde das LA-ICP-MS wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit Helium gespült und mittels des Standardreferenzglases NIST 612 auf die maximalen Intensitäten eingestellt.

Die im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Bankfalvi angefertigten schockgefrorenen Schnitte wurden auf einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Aluminiumblock zum Analysengerät transportiert. Anschließend wurde der Gewebeschnitt in der auf

-15 °C temperierte Kryoablationskammer positioniert und die Kammer wurde verschlossen. Nach einer Spülzeit von 30 Minuten ist die Atmosphäre in der Messanlage vollständig durch das Transportgas Helium ausgetauscht. Dieser Schritt ist nicht nur für die Sauerstoffminimierung, sondern auch für die Reduzierung der durch den gefrorenen Gewebeschnitt eingetragenen Wasseranteile von großer Bedeutung.

Im nächsten Schritt wurde eine Analyse der Hintergrundbelastung der zu untersuchenden Elemente ohne Ablation der Probe durchgeführt. Durch diesen Schritt werden auch polyatomare Interferenzen detektiert, wie z.B. die Bildung von $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ - und $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$ -Ionen. Große Intensitäten auf m/Z 31 und 54 sind ein sehr guter Indikator für eine Leckage in der Messapparatur, welches zum Eintritt von Luftsauerstoff und –stickstoff führt. Die Bildung dieser Interferenzen führen bei der Detektion von ^{31}P und ^{54}Fe zu einem falschen Messergebnis.

Anschließend wurde mittels der eingebauten CCD-Kamera ein Foto der Probe erstellt, in dem die Kamera viele Einzelbilder von der Probenoberfläche zu einem Gesamtbild zusammenfügte. Diese Abbildung wurde zur Orientierungshilfe genutzt, da die Optik der Kamera lediglich eine Aufnahme von $400\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$ darstellen kann.

Im Folgenden wurde das Ablationsmuster einprogrammiert, so dass die gesamte Probenfläche mit parallel zueinander ausgerichteten Ablationslinien bedeckt war. Der Abstand benachbarten Linien war so gewählt, dass eine Überschneidung von ca. 10 % - 15 % des gewählten Laserstrahldurchmessers gegeben war. Diese gewährleistet eine vollständige Probenablation.

Tabelle 13: LA-ICP-MS Parameter zur Analyse von Mammakarzinomschnitten

LA-ICP-MS Messparameter	
Rf-Power [W]	1550
Flussrate Plasmagas [L/min] (Ar)	15
Flussrate Trägergas [L/min] (Ar)	1,1 - 1,2
Scan modus	Peak hopping
Messzeit pro m/Z [s]	0,1
Laserstrahldurchmesser [μm]	200
Ablationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	50
Isotope	^{13}C , ^{31}P , ^{34}S , ^{54}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{129}Xe
Flussrate Ablationsgas [L/min] (He)	1,2 - 1,3
Frequenz [Hz]	20
Energiedichte [mJ/cm^2]	0,8
Aufwärmzeit des Lasers [s]	5
Auswaschzeit nach Linienablation [s]	20

Durch die festgelegte Linienlänge und die LA-ICP-MS Messparameter wurde mittels eines Excel-Sheets die benötigte Linien- und Gesamtablationszeit errechnet. In der ICP-MS Software wurde der Sequenzaufnahmefmodus auf die Linienablationszeit und die Linienanzahl eingestellt, so dass die Daten einer Linienablation in einer separaten Datei gespeichert wurden.

3.4 Auswertung der orts aufgelösten Elementanalytik

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der neu entwickelten Software LA-ICP-MS UniDuE. Nach der entwickelten Analyse wurden die detektierten ICP-MS Intensitäten von den raw-Daten in die cps-Daten transformiert. In diesem Schritt wurden die Messergebnisse auf die in einer Sekunde gemessene Zählrate (engl. Counts) normiert. Die cps-Daten werden anschließend in das csv-Format umgewandelt (comma separated value) und können so in die Software eingelesen werden.

Aus der Laserablations-Software (MEOLaser) wurden die Linienkoordinaten und die je Sekunde bestimmte Laserenergie ausgelesen. Außerdem wurde das vor und nach der Ablation erzeugte Foto des Gewebeschnitts benötigt.

Die Berechnung der y-Koordinate erfolgte durch die Multiplikation der Messzeit mit der Ablationsgeschwindigkeit.

$$\text{Messzeit [s]} \times \text{Ablationsgeschwindigkeit} \left[\frac{\text{mm}}{\text{s}} \right] = \text{Breite [mm]}$$

Formel 4: Berechnung der y-Koordinate einer LA-ICP-MS Messung

Die zugehörige x-Koordinate ergab sich aus dem Linienabstand der einzelnen Ablationslinien.

$$\text{Linienabstand [mm]} = \text{Länge [mm]}$$

Formel 5: Berechnung der x-Koordinate einer LA-ICP-MS Messung

Bei der Erstellung eines Kontourplots wurden die Intensitätswerte des ICP-MS den jeweiligen Messzeiten zugeordnet. Da die Daten jeder Linienablation in einer einzelnen Datei gespeichert wurden, ist die Zuordnung der x-Koordinaten bereits festgelegt.

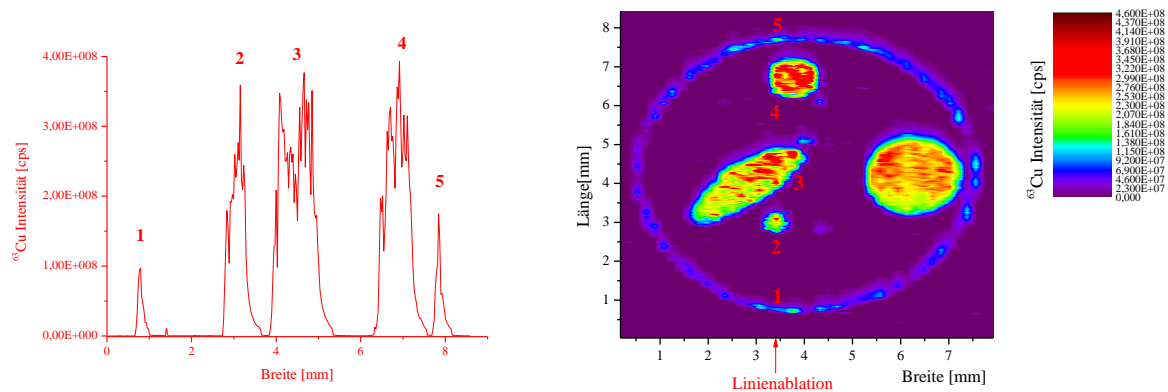


Abbildung 21: Auswertung der LA-ICP-MS Daten: ^{63}Cu -Intensitäten einer Linienablation (links), mit LA-ICP-MS UniDuE berechneter Konturplot des Elements Kupfer

Dieses Prinzip der Datenauswertung ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Illustration zeigt auf der linken Seite die Intensitäten einer Linienablation, welche nach der Auswertung durch das Aneinanderreihen aller ablierten Linien einen Konturplot des Kupfers ergibt. Der rote Pfeil an der Abszisse der rechten Abbildung signalisiert den Startpunkt der Linienablation und die nummerierte Zuordnung der Signale der linken Abbildung zum Konturplot zeigen die sehr gute Korrelation der Ergebnisse.

LA-ICP-MS UniDuE erstellte aus den importierten Daten zum einen zur visuellen Kontrolle und ersten Auswertungsschritten einen Konturplot des ausgewählten m/Z-Verhältnisses. Durch die auf dem GUI der Hauptseite abgebildeten fotografischen Aufnahmen der Probe vor und nach der Ablation und des Konturplots der gemessenen Laserenergie kann eine direkte orts aufgelöste Korrelation zwischen Probe und erstelltem Isotopen-Konturplot durchgeführt werden. Bei einer mehrtägigen Analyse werden die zuvor pro Messtag ausgewerteten Datensätze in LA-ICP-MS UniDuE zusammengefasst.

Zur anschließenden genaueren Analyse wurden die LA-ICP-MS UniDuE Daten im TDMS-Dateiformat gespeichert und in Origin 8.5 importiert, um sowohl die statistischen Auswertemethoden als auch die sehr guten grafischen Darstellungsmöglichkeiten zu nutzen.

3.5 Anfertigung der Mammakarzinomschnitte und Durchführung der immunhistochemischen Analysen

Die Mammakarzinomschnitte wurden am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Bankfalvi angefertigt.

Hierzu wurden aus einem Block an Krebsgewebe, welcher bei -80°C gelagert wurde, mittels eines Kryomikrotoms Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm hergestellt. Für die Untersuchungen wurden jeweils mehrere Parallelschnitte angefertigt, von denen einer für die orts aufgelöste Elementanalyse mittels LA-ICP-MS vorgesehen war und der andere für eine H&E Färbung. Die Proben werden anschließend auf einem Glasobjektträger platziert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Alle immunhistochemischen Analysen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie von HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), MT (Metallothionein), Ki-67 (Protein) und die Karzinomklassifizierung mittels H&E (Hematoxylin und Eosin) Färbung wurden am Universitätsklinikum Essen von Prof. Dr. Bankfalvi durchgeführt.

3.6 Orts aufgelöste Elementanalytik mittels µ-RFA

Die Untersuchungen der Mammakarzinome mittels orts aufgelöster Röntgenfluoreszenzspektroskopie wurden an der Fachhochschule Münster im Labor für instrumentelle Analytik zusammen mit Dipl. Ing. Georg Wacker durchgeführt.

Die im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen angefertigten Parallelschnitte (Kapitel 3.5, S.70) wurden in einer mit Trockeneis befüllten Styroporkiste zur Fachhochschule Münster transportiert. In Münster wurden die Proben wiederum bei -80°C gelagert um bis zur Messung

gegenüber der LA-ICP-MS Analysen keine Messwertverfälschung durch Variation in der Probenvorbereitung hervorzurufen.

Die auf einem Glasobjektträger fixierten Gewebeproben wurden auf dem mittels Stellmotoren in x-, y- und z-Richtung justierbaren Probentisch positioniert. Mittels der in der $600 \times 350 \times 260$ mm großen Probenkammer eingebauten Kamera erfolgte die korrekte Messtischausrichtung. Die Fokussierung der Probenoberfläche geschah mittels des eingebauten Autofocus-Systems, wodurch eine exakte und reproduzierbare Ermittlung des Brennpunktes der Röntgenstrahlen stattfindet.

Anschließend wurde ein Vakuum von 10 mbar auf die Probenkammer angelegt und die in Tabelle 14 aufgelisteten Messparameter eingestellt.

Tabelle 14: Messparameter der orts aufgelösten Röntgenfluoreszenzanalyse

Röntgenröhre (Anodenmaterial)	Rhodium
Detektor	Silicondriftdetektor; 30 mm^2 Detektorfläche
Elemente	C, P, S, Fe, Cu, Zn
Spannung [kV] / Strom [μA]	50 / 600
Druck in der Probenkammer [mbar]	10
Röntgenstrahldurchmesser [μm]	25
Abstand der Messspots [μm]	25
Messzeit pro Spot [ms]	3
Messzyklen	5

Die Auflösung der μ -RFA Messung betrug durch die identische Wahl von Röntgenstrahldurchmesser und Abstand der Messspots $25 \mu\text{m}$. Die vollständige Vermessung des Gewebeschnittes erfolgte im Spotmodus mit einer Messzeit von 3 ms pro Spot. Insgesamt wurden 5 Messzyklen durchlaufen und die detektierten Daten nach Beendigung der Messung aufsummiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Methodenoptimierung der LA-ICP-MS

Die Methodenoptimierung der orts aufgelösten Elementanalytik von Mammakarzinomschnitten erfolgte, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, durch die Ablation von Druckerproben. Zur Ermittlung der optimalen Messparameter wurden die Messzeit pro Isotop, sowie der Laserstrahldurchmesser und die Ablationsgeschwindigkeit variiert. Diese Parameter beeinflussen die Praktikabilität der Methode in Bezug auf die Gesamtmesszeit, welche pro Analyse zwischen zwei und 30 Stunden variiert, und die Auflösung des Konturplots [LEAR *et al.* 2012].

4.1.1 Untersuchung unterschiedlicher Messzeiten

Da ein Quadrupol-ICP-MS keine simultane Intensitätsaufnahme der ausgewählten m/Z -Verhältnisse durchführen kann, muss dem Gerät eine Messzeit pro Isotop vorgegeben werden.

Bei einer Quantifizierung mit Flüssigaufgabetechnik, bei der genügend Probe vorhanden ist, spielt diese Messzeit pro m/Z -Verhältnis eine untergeordnete Rolle.

Während einer orts aufgelösten Analyse wird das Gewebe fortwährend durch die Laserablation beprobt, so dass bei einer großen Messzeit pro Isotop ein Informationsverlust bezüglich der anderen Isotope hinsichtlich des zu diesem Zeitpunkt im Plasma befindlichen Materials entsteht. Das Ziel einen Elementkontourplot mit einer hohen Informationsdichte zu erzeugen hat zur Folge, dass die zu analysierende Anzahl an Isotopen nicht größer als zehn sein sollte und eine kleine Messzeit pro Isotop gewählt wird.

Trotz dieser Limitation der LA-ICP-MS Messungen wird die Multielementfähigkeit der Methode genutzt, um neben dem Hauptfokus auf dem Element Zink andere wichtige Proteinheteroelemente wie Schwefel und

Phosphor, sowie weitere Metalle wie Eisen und Kupfer in die Untersuchungen mit aufzunehmen. Alle variierten Messparameter sind Tabelle 8 (S.59) zu entnehmen.

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der LA-ICP-MS Messung mit einer Messzeit von 0,05 Sekunden pro Isotop zu sehen. Der abgebildete Kontourplot zeigt die gemessenen Intensitäten des ^{63}Cu -Isotops des Elements Kupfer.

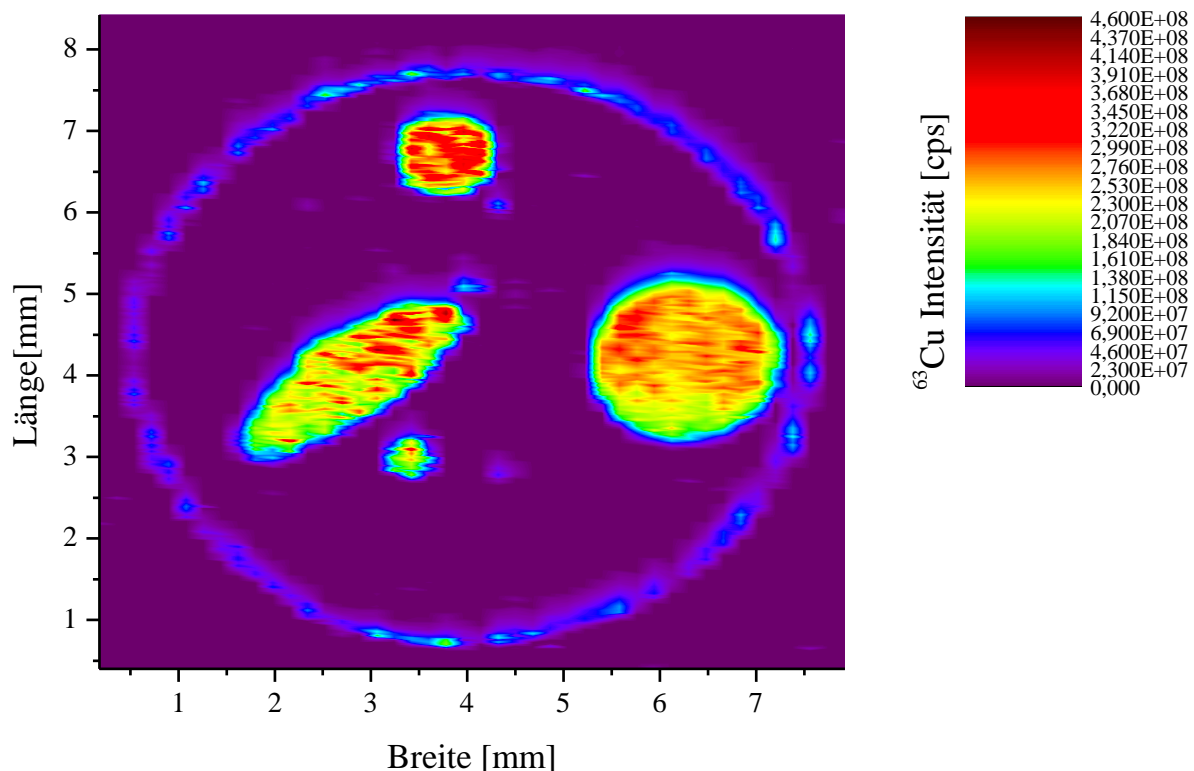


Abbildung 22: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Messzeit von 0,05 s pro Isotop (Laserstrahldurchmesser 200 μm , Ablationsgeschwindigkeit 50 $\mu\text{m/s}$)

In Abbildung 23 ist eine CCD-Kameraaufnahme der Druckerprobe in der Ablationskammer zu sehen. Die dunklen Schattierungen an den Kästchenrändern werden durch die Einzelaufnahmen hervorgerufen, welche dann nachträglich zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

Die Korrelation zwischen dem Cyan-Blau-Farbdruck und dem Kupfer-Kontourplot zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Wie die CCD-Kameraaufnahme zeigt, ist der Laserdrucker nicht in der Lage, die in der

PowerPoint-Vorlage eingezeichneten Kreise mit einem Durchmesser von 100 μm , aufzudrucken. Die Auflösungsgrenze des Laserdruckers liegt bei 200 μm .

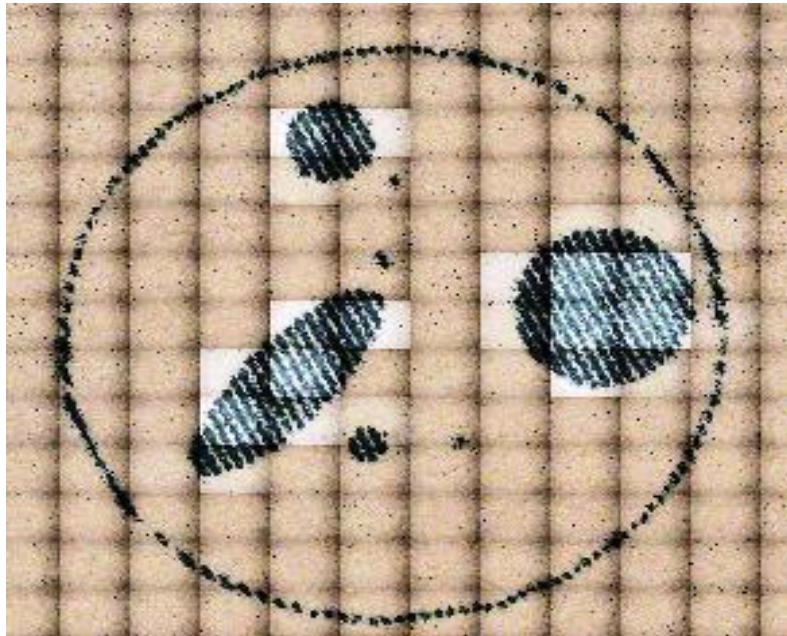


Abbildung 23: CCD-Kameraaufnahme der Druckerprobe in der Ablationskammer

Die Variation der Messzeit pro Isotop von 0,05 s auf 0,1 s pro m/Z ist in Abbildung 24 illustriert. Auch bei diesen Parametern ist eine eindeutige Kongruenz zwischen der CCD-Kameraaufnahme und dem Elementkonturplot zu erkennen.

In beiden Konturplots (Abbildung 22, Abbildung 24) ist zu sehen, dass das LA-ICP-MS System mit den gewählten Parametern die drei 200 μm -Kreise abbilden kann.

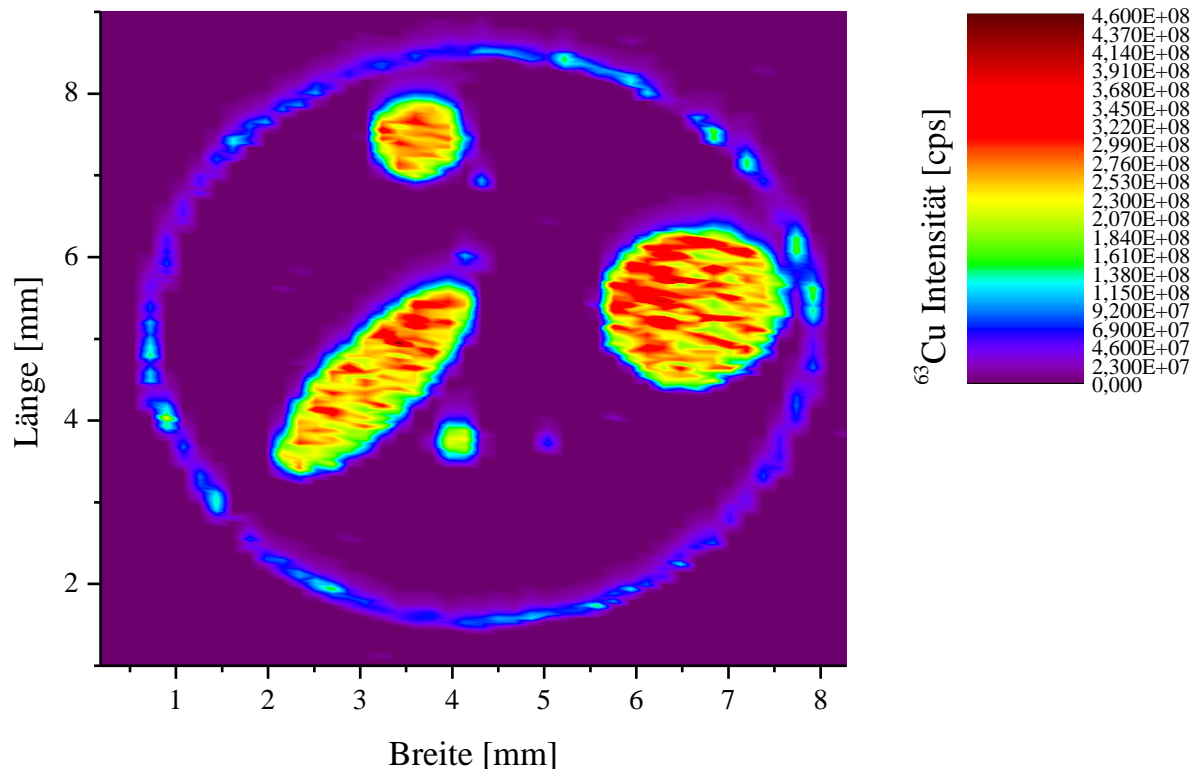


Abbildung 24: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Messzeit von 0,1 s pro Isotop (Laserstrahldurchmesser 200 μm , Ablationsgeschwindigkeit 50 $\mu\text{m/s}$)

So kann erfolgreich nachgewiesen werden, dass Objekte analysiert werden können, welche eine identische Dimension wie der verwendete Laserstrahldurchmesser aufweisen.

Diese Technik wird in der Literatur als sogenanntes „oversampling“ beschrieben [SETOU 2010; YUE *et al.* 2007]. Durch die vollständige oder nahezu vollständige Ablation und die langsame Ablationsgeschwindigkeit trägt nicht der gesamte Laserstrahldurchmesser zum Ablationsprozess der Probe bei. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass auch Objekte analysiert werden können, deren Durchmesser gleich groß oder kleiner als der Durchmesser des Laserstrahls ist.

Des Weiteren ist zu sehen, dass in dem Konturplot sowohl bei 0,05 s als auch bei 0,1 s Messzeit pro m/Z Verhältnis teilweise eine Darstellung der Druckpunkte zu erkennen ist. Bei der Messzeit von 0,05 s sind die Linien im größten Kreis der Probe, mit einem 0,2 cm großen Durchmesser, feiner

abgebildet, jedoch zeigt sich in allen Objekten eine große Varianz in der detektierten Intensität. Für diesen Vergleich sind die Intensitätsskalen beider Konturplots gleich skaliert, so dass ein direkter Intensitätsvergleich möglich ist.

4.1.2 Untersuchung unterschiedlicher Laserstrahldurchmesser

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Methodenoptimierung ist der Durchmesser des Laserstrahls. Dieser stellt neben der Ablationsgeschwindigkeit einen der abbildungslimitierenden Faktoren dar. Verglichen werden die Durchmesser von 125 μm und 200 μm bei sonst identischen Messeinstellungen. Da in diesem Fall der geringere Durchmesser direkten Einfluss auf den Ablationsprozess besitzt, wurden die Konturplot so skaliert, dass die maximale ^{63}Cu -Intensität als höchstes Niveau festgelegt wurde. So sind die beiden Abbildungen trotz unterschiedlichen Probeneintrages ins Massenspektrometer vergleichbar.

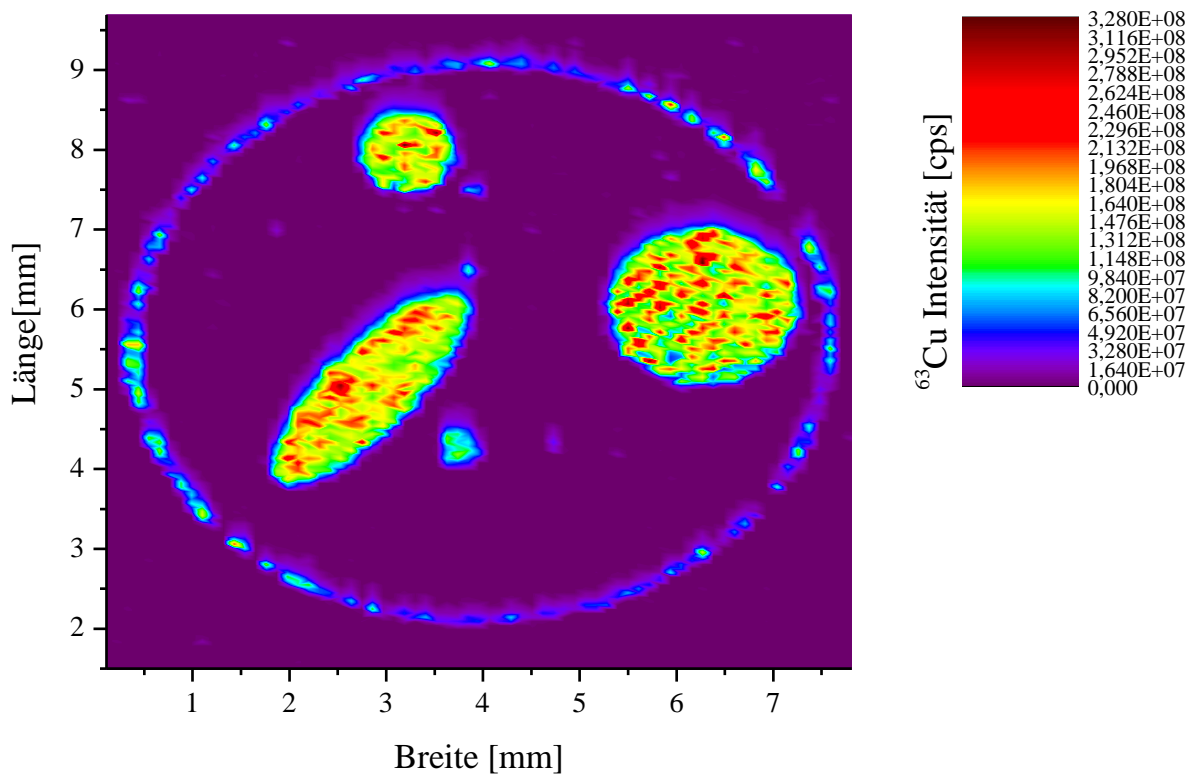


Abbildung 25: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einem Laserstrahldurchmesser von 125 μm

Sowohl in Abbildung 25 als auch in Abbildung 27 sind alle aufgedruckten Formen zu sehen. Bei dem Vergleich des Kreises mit dem Radius 0,2 cm (Abbildung 26, Nr. 1) ist zu erkennen, dass bei einem Laserstrahldurchmesser von 125 μm eine deutlichere Darstellung der Druckerpunkte zu identifizieren ist.

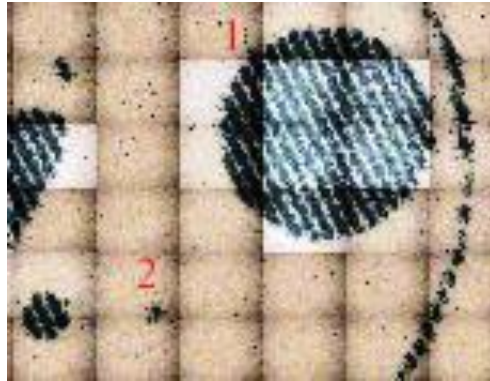


Abbildung 26: Ausschnitt der Druckerprobe des Kreises mit dem Radius 0,2 cm

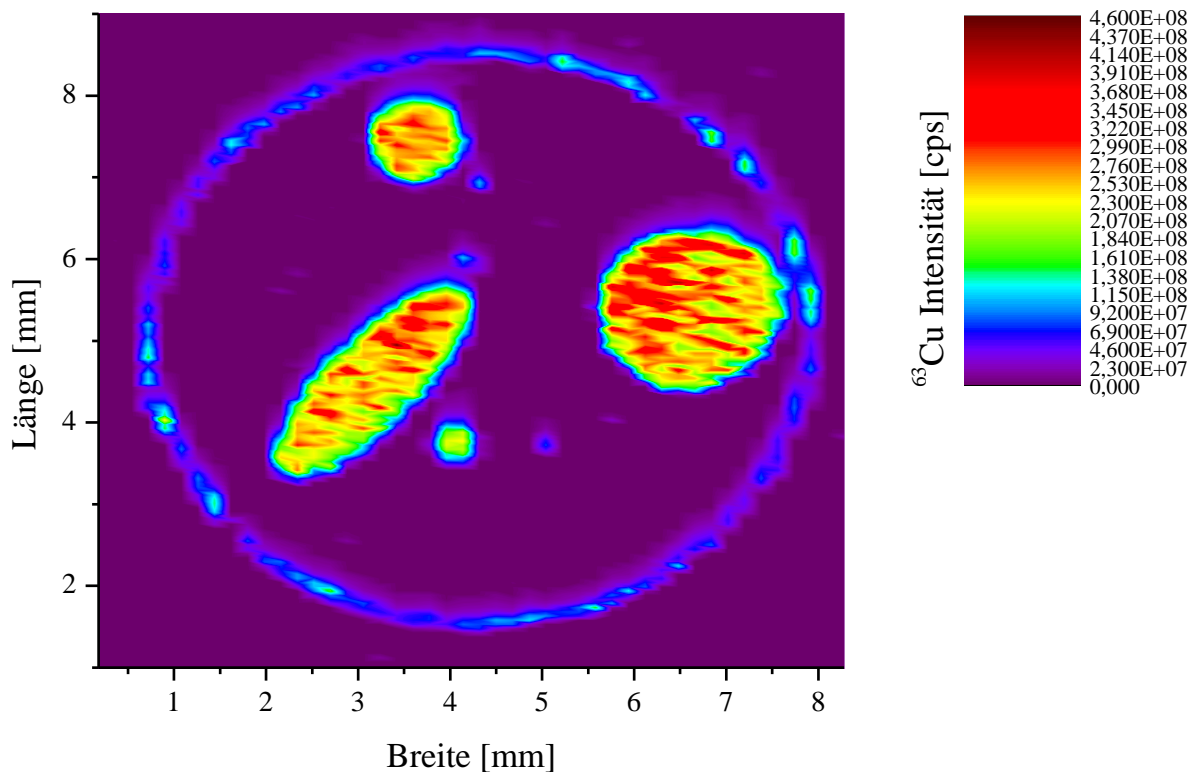


Abbildung 27: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einem Laserstrahldurchmesser von 200 μm

Durch die Reduzierung des Laserstrahldurchmessers wird jedoch auch die ablierte Probenmenge minimiert, was dazu führt, dass der Kreis mit Radius 200 μm (Abbildung 26, Nr. 2) nicht korrekt dargestellt wird.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die LA-ICP-MS Parameter auch unter dem Aspekt der Praktikabilität betrachtet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der LA-ICP-MS Analyse von sehr groß dimensionierten Proben eine unvollständige Ablation durchgeführt worden ist [BECKER *et al.* 2007; URGAST *et al.* 2012]. Dieser Teil wird bei Erstellung eines Konturplot mathematisch interpoliert.

Um eine Analysenzeit von weniger als 12 Stunden zu erzielen, bei einer vollständigen Ablation einer gängigen Probengröße dieser Untersuchungen, fällt die Wahl auf den größeren Laserstrahldurchmesser. Diese Entscheidung lässt sich neben den sehr guten Abbildungstiefe durch das Oversampling auch noch durch die homogenen Intensitätsdetektionen begründen. Da die gesamte Druckvorlage mit einer 100 %-igen Farbinsintensität abgebildet wurde, sollten die Kupfer-Intensitäten der unterschiedlichen Formen ein gleiches Intensitätsniveau zeigen.

4.1.3 Untersuchung unterschiedlicher Ablationsgeschwindigkeiten

Der dritte untersuchte Parameter im Rahmen der Methodenoptimierung ist die Ablationsgeschwindigkeit. Es werden Geschwindigkeiten von 50 $\mu\text{m/s}$ und 100 $\mu\text{m/s}$ mit einem Laserstrahldurchmesser von 200 μm untersucht. Die Wechselwirkung zwischen der Ablationsgeschwindigkeit, dem Laserstrahldurchmesser und der Messzeit pro Isotop sind sehr komplex [TRIGLAV *et al.* 2010]. Durch den Laserstrahldurchmesser wird die Menge an Probe beeinflusst, die mittels des Ablationsgasstroms ins ICP-MS eingetragen wird. Die Steigerung der Ablationsgeschwindigkeit kann durch einen unvollständigen Aerosoltransport zu Rückvermischungseffekten führen, wodurch das Messergebnis verfälscht wird [LEAR *et al.* 2012].

In Abbildung 28 ist der Konturplot des Elements Kupfers mit einer Ablationsgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{m/s}$ zu sehen.

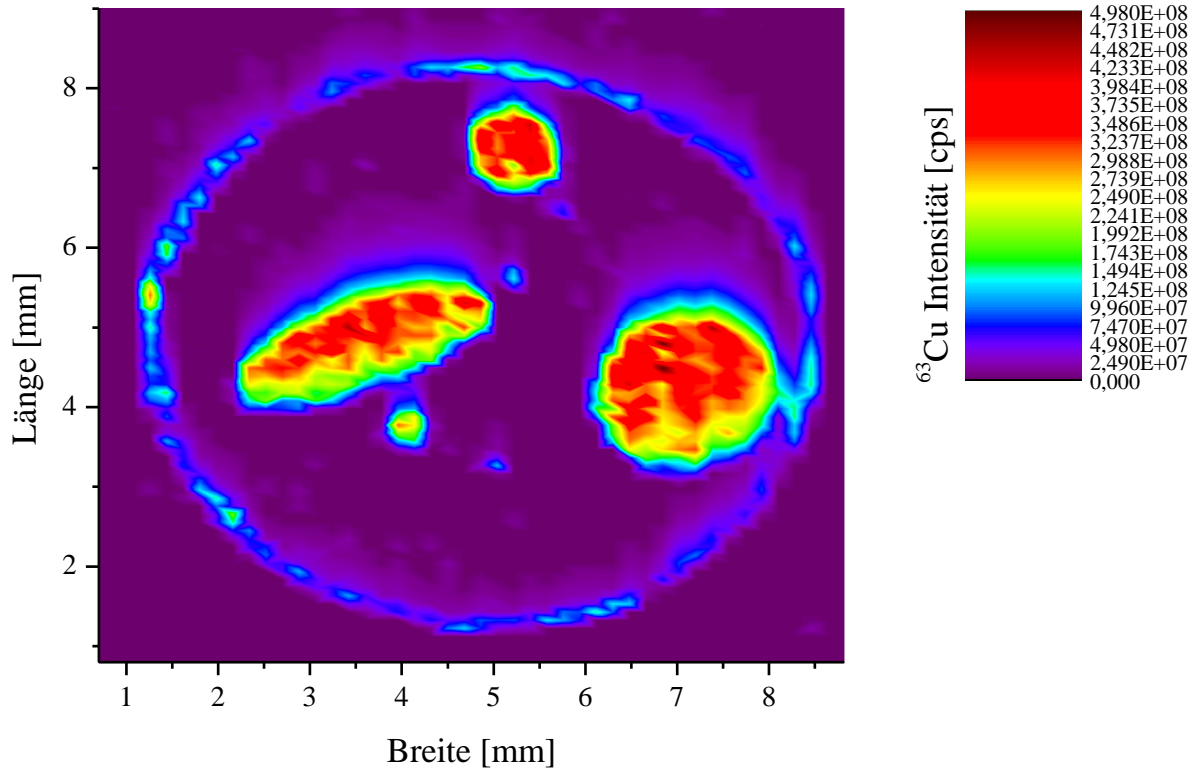


Abbildung 28: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Ablationsgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{m/s}$

Die Konturen der aufgedruckten Formen sind zu erkennen, jedoch zeigt sich, dass die Druckerpunkte in den Formen nicht dargestellt werden können. Der Vergleich mit dem Konturplot von 50 $\mu\text{m/s}$ Ablationsgeschwindigkeit verdeutlicht die schlechtere Auflösung.

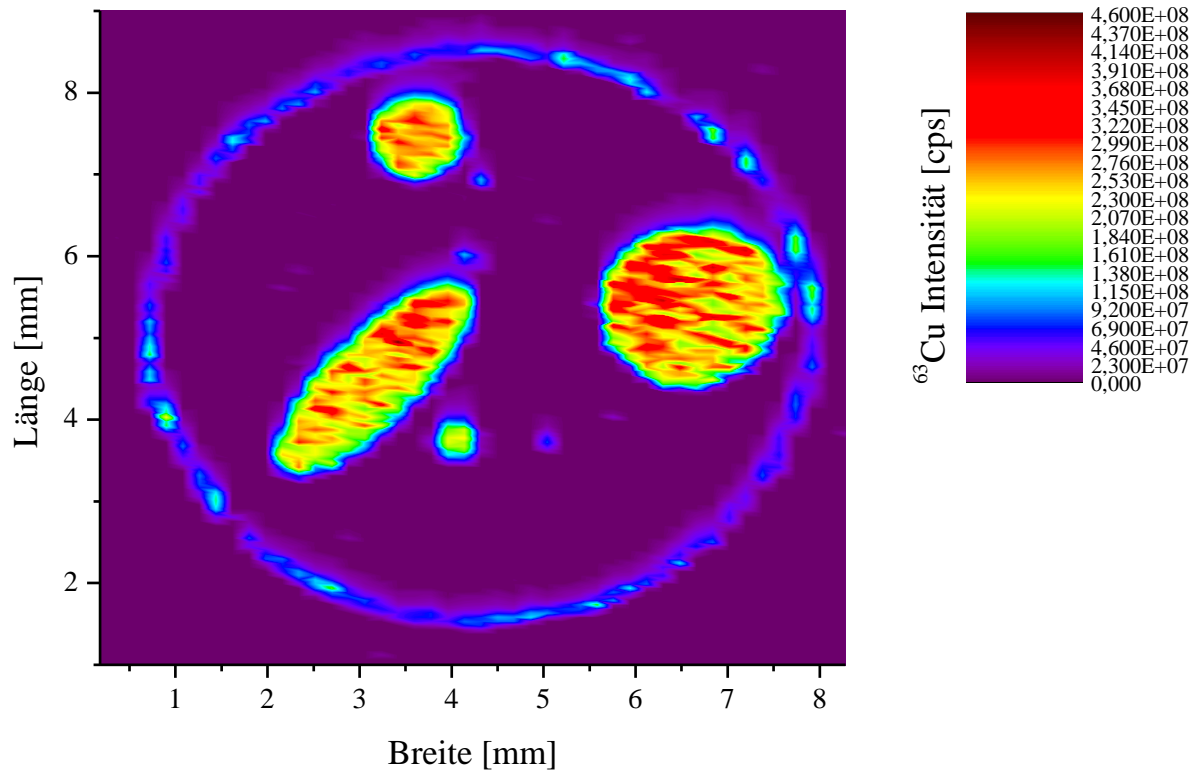


Abbildung 29: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Ablationsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$

4.1.4 Berechnung des Abbildungsfaktors

Ein weiterer wichtiger Aspekt hinsichtlich der Methodenoptimierung ist die Detektion einer zu geringen Elementintensität von sehr klein dimensionierten Objekten. Bellis [BELLIS UND SANTAMARIA-FERNANDEZ 2010] beschreibt das Auftreten dieses Phänomens durch einen sich nicht ausbildenden Gleichgewichtszustand im Plasma der ICP-MS aufgrund einer zu geringen Probenmenge. Dieser Effekt konnte bei allen Untersuchungen zur Methodenoptimierung ebenfalls beobachtet werden. Für den Vergleich der unterschiedlichen Parameter werden wegen der Variation des Laserstrahldurchmessers die Kreise mit Radien 0,05 cm und 2,0 cm herangezogen. Da für die Erstellung des Konturplots die Signalhöhe genutzt wird, werden diese bei der Berechnung der Verhältnisse zu Grunde gelegt.

Aus den Maxima der Signalintensitäten wird ein Faktor berechnet, der aufgrund der identischen relativen Farbdichte von 100 % bei eins liegen sollte.

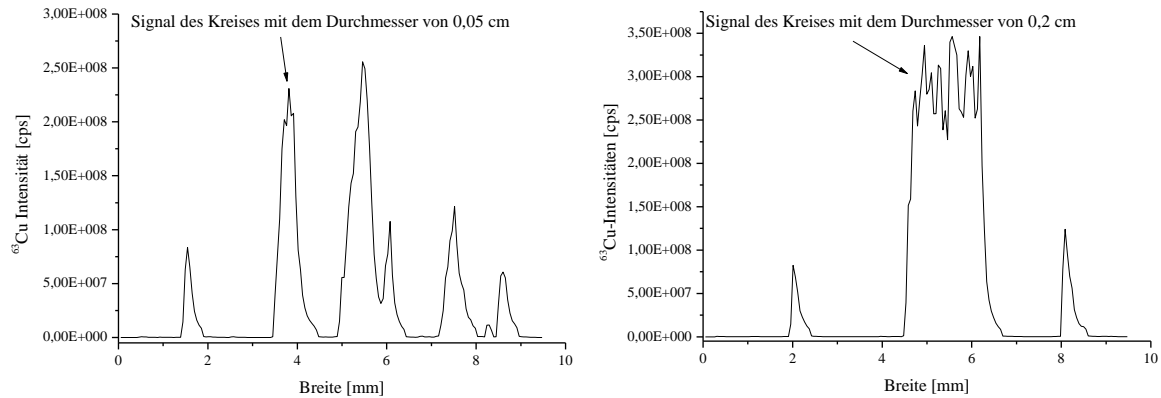


Abbildung 30: Detektierte Kupferintensitäten einer Linienablation mit einem Laserstrahldurchmesser von 200 μm , einer Ablationsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$ und einer Messzeit pro m/Z Verhältnis von 0,1 s. Links von Linie 23 und rechts von Linie 36 des Konturplots

In Abbildung 30 sind jeweils die detektierten Kupfer-Intensitäten der Linienablationen der beiden Objekte abgebildet (zur graphischen Visualisierung Abbildung 21, S.69). Alle weiteren Spektren zur Parametervariationen sind Kapitel 10.1 (S.182) zu entnehmen.

Anschließend wird die maximale Intensität bestimmt und der Abbildungsfaktor IF (image factor) berechnet.

$$IF = \frac{\max(63\text{Cu Intensität vom Kreis } d = 0,05\text{cm})}{\max(63\text{Cu Intensität vom Kreis } d = 0,2\text{cm})}$$

Formel 6: Berechnung des Abbildungsfaktor IF (image factor)

In Tabelle 15 sind die IFs den einzelnen Optimierungsparametern zugeordnet.

Tabelle 15: Berechnung der Faktoren zum Intensitätsvergleich

	Ablationsgeschw.: 50 µm/s Laserspot: 125 µm Messzeit pro m/Z: 0,1 s	Ablationsgeschw.: 100 µm/s Laserspot: 200 µm Messzeit pro m/Z: 0,1 s	Ablationsgeschw.: 50 µm/s Laserspot: 200 µm Messzeit pro m/Z: 0,05 s	Ablationsgeschw.: 50 µm/s Laserspot: 200 µm Messzeit pro m/Z: 0,1 s
Kreisdurchmesser 0,05 cm [cps]	1,03E+08 ±3,39E+06	2,51E+08 ±7,54E+06	3,58E+08 ±8,96E+06	2,62E+08 ±7,86E+06
Kreisdurchmesser 0,2 cm [cps]	2,51E+08 ±7,52E+06	3,63E+08 ±1,27E+07	4,30E+08 ±1,29E+07	3,36E+08 ±1,01E+07
Ablationsfaktor IF	2,44±0,10	1,44±0,05	1,20±0,04	1,28±0,04

Die größte Messwertungenauigkeit ergab sich aus der Berechnung des IF mit den Parametern von 50 µm/s Ablationsgeschwindigkeit, 125 µm Laserstrahldurchmesser und 0,1 s Messzeit pro m/Z Verhältnis. Das bedeutete, dass mit diesen Methodenparameter für zwei unterschiedlich dimensionierte Probenareale gleicher Analytkonzentration divergierenden Intensitäten detektiert werden.

Der Hauptgrund für diesen hohen IF Wert ist auf die geringere Probenmenge pro Laserpuls zurückzuführen, wodurch sich im Plasma kein Gleichgewichtszustand ausbilden konnte.

Die Berechnung der IFs der drei anderen Parametervariationen liegen deutlich näher an dem Idealfall von IF = 1 und sind folglich für diese Untersuchungen besser geeignet. Bei der Druckeranalyse mit der Ablationsgeschwindigkeit von 100 µm/s ist der Abbildungsfaktor mit 1.44 am größten von den drei ausgewählten. Außerdem ist zu erwähnen, dass die größte Ablationsgeschwindigkeit einen strukturarmen Konturplot erzeugt hat (Abbildung 28). Dies lässt sich durch die Rückvermischungseffekte während des Aerosoltransportes erklären.

Die berechneten Ablationsfaktoren der unterschiedlichen Messzeit pro m/Z Verhältnis liegen numerisch so nah beieinander, dass sich die Standardabweichungsintervalle überschneiden.

Da bei diesem Experiment sowohl Ablationsgeschwindigkeit als auch Laserstrahldurchmesser identische Einstellungen aufweisen, zeigt sich, dass der Einfluss der Messzeit pro Isotop einen geringeren Einfluss auf die Abbildungseigenschaften besitzt.

Der Vergleich der beiden Kupfer-Konturplots (Abbildung 31) verdeutlicht, dass bei einer Messzeit von 0,05 s pro Isotop die Formen mit dem Radius 200 μm nicht oder nur unzureichend dargestellt werden.

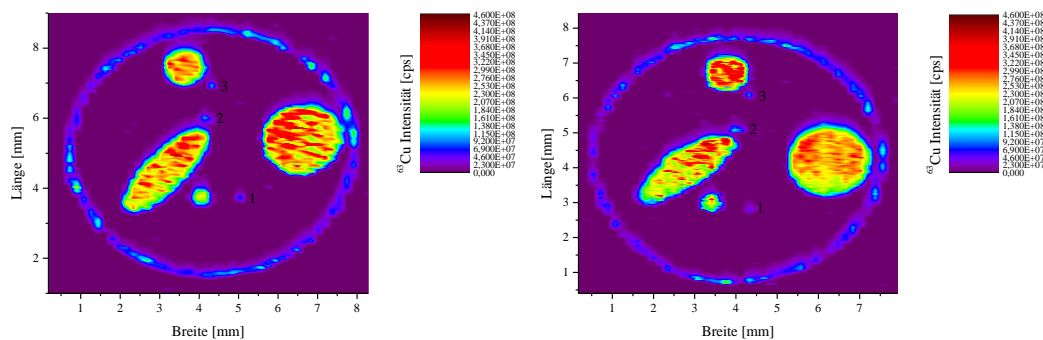


Abbildung 31: Vergleich der Abbildungsfaktoren bei 0,1 s (links) und 0,05 s (rechts) Messzeiten pro m/Z Verhältnis

Kreis Nr.1 wird nur teilweise detektiert, während Kreis Nr. 2, andere Konturen als die Druckerprobe aufweist. Bei einer Messzeit von 0,1 s pro m/Z Verhältnis sind alle drei Kreise homogen sowohl hinsichtlich Kontur, als auch der detektierten Intensitäten abgebildet.

4.2 Bestimmung der Elementkonzentration mittels LA-ICP-MS

4.2.1 Kalibration

Aufgrund des Einflusses der Matrix auf die Aerosolbildung während des Ablationsprozesses und der Ionisation in der Plasmafackel ist die

Quantifizierung mit der LA-ICP-MS aufgrund nicht erhältlicher zertifizierter Referenzmaterialien (CRM) schwierig. Die quantitative Analyse erfolgt durch die Verwendung matrixangepasster Kalibrationsstandards. Bei diesem Verfahren wird entweder das Homogenisat eines Gewebes oder ein Polyacrylamidgel verwendet, welches anschließend mit definierten Konzentrationen einer Elementstandardlösung versetzt wird [BECKER *et al* 2007, HARE *et al.* 2010].

Aufgrund des flüssigen Aggregatzustandes der Acrylamidmatrix kann diese besser mit dem Elementstandard homogenisiert werden und führt so zu einer gleichmäßigen Verteilung im Mikrotomschnitt. Dies ist für die Linienablation mit der LA-ICP-MS von großer Bedeutung. Außerdem ist diese Methode im Institut für Umweltanalytik in einer Arbeit von Herrn Müller [MÜLLER 2012] validiert worden.

Das Acrylamidgel wird mit den ICP-MS Standardlösungen gemischt und in ein Gewebeschälchen gefüllt. Nach der Polymerisation wird der Standard mit flüssigem Stickstoff gefroren und mittels eines Kryomikrotoms werden Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm angefertigt. Der Konzentrationsbereich der matrixangepassten Standards liegt zwischen 0,05 ppm und 50 ppm.

Neben der Problematik der CRMs kann bei den meisten Quantifizierungsansätzen kein interner Standard (IS) eingesetzt werden, um Messwertverfälschungen durch z.B. Ionisationseffekte zu berücksichtigen. Eine häufig verwendete Lösung ist die Verwendung des Kohlenstoffisotops ^{13}C als internen Standard, da dieses Element in den biologischen Proben in einer großen Massenkonzentration enthalten ist.

Es ist jedoch zu erwähnen, dass sowohl die Masse als auch die erste Ionisierungsenergie gegenüber einer Großzahl von Analyten stark divergiert und dieser Lösungsansatz somit nur bedingt zielführend ist. Außerdem werden ^{13}C Intensitäten auch ohne durchgeführte Ablation, als Hintergrundbelastung

durch Verunreinigungen im Argongas, oder durch Austritt aus den Materialien der Gasleitungen im ICP-MS detektiert [DURRANT 1992, REGE *et al.* 2005].

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die ^{13}C -Konzentration aufgrund unterschiedlicher Gewebestrukturen oder variierender Gewebewasserkonzentration nicht homogen in der Probe verteilt ist [ZORIY *et al.* 2008].

Die Mammakarzinomproben besitzen durch die Krebszellverbände und die Stromaanteile eine stark unterschiedliche Gewebestruktur, wodurch die Eignung des ^{13}C -Isotops als interner Standard ebenfalls nicht gegeben ist. Abschließend ist anzumerken, dass der 10 μm Gewebeschnitt vollständig abliert wird, so dass unter der Annahme des annähernd verlustfreien Aerosoltransports die Probe vollständig in das ICP-MS gelangt.

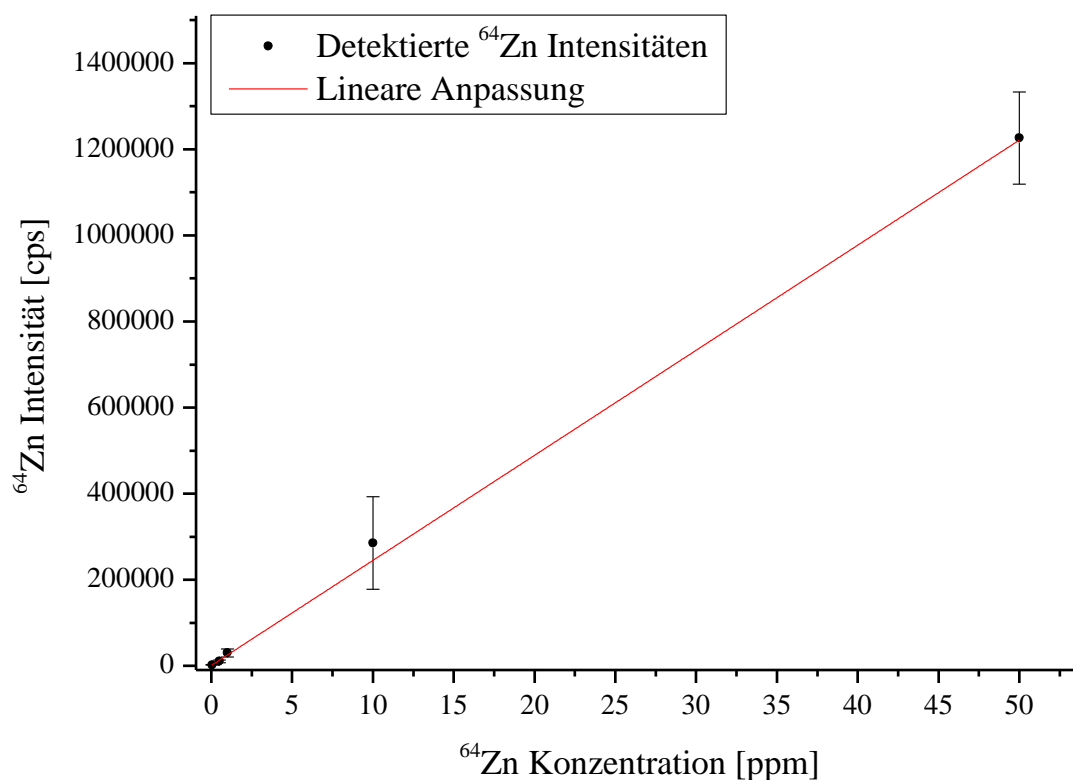


Abbildung 32: Detektierte Messwerte bei der LA-ICP-MS Analyse der matrixangepassten Kalibrationsstandards

In Abbildung 32 sind die Hintergrund-subtrahierten Intensitäten der Messwerte gegen die Konzentrationen von 0,05 ppm bis 50 ppm aufgetragen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient beträgt 0,9968, wodurch der lineare Zusammenhang zwischen der Ausgleichsgerade (Abbildung 32, rote Linie) und den Messwerten gegeben ist.

In Tabelle 16 sind die detektierten Intensitäten mit den jeweiligen Standardabweichungen aufgelistet.

Tabelle 16: Detektierte Zink Intensitäten der matrixangepassten Kalibrationsstandards

Zn Konzentration [ppm]	Zn Intensität [cps]	Standardabweichung [cps]
Blindwert	1174,33	±103,42
0,05	2278,02	±347,99
0,50	10892,76	±3098,20
1,00	30285,52	±9387,94
10,00	285395,49	±99492,67
50,00	1226263,19	±107280,59

Die Nachweisgrenze beträgt 0,103 ppm und wird nach Formel 7 berechnet.

$$NWG = 3 \times \text{Blindwert}$$

Formel 7: Berechnung der Nachweisgrenze

Becker bestimmte eine Nachweisgrenze von 0,140 ppm für das Element Zink [BECKER *et al.* 2007].

4.2.2 Interferenzen

Eine Schwachstelle des ICP-MS ist die Detektion von isobaren oder polyatomaren Interferenzen. Hierbei handelt es sich um Molekülonen mit gleichem m/Z Verhältnis wie das Analytmolekül und somit um eine Messwertverfälschung bei der Quantifizierung. Bei einer isobaren Interferenz wird ein Isotop mit gleichem m/Z Verhältnis, eines ebenfalls in der Probe vorhandenen anderen Elements mit detektiert. Die polyatomare Interferenz zeichnet sich durch eine Plasmareaktion von z.B. Argon und Sauerstoff aus. Durch die Detektion dieses Molekülonen kann das Element Eisen mit $m/Z = 56$ lediglich auf weniger abundanten Isotopen analysiert werden.

Die Minimierung dieses Problems kann durch die Detektion von mehreren Isotopen eines einzelnen Elementes erfolgen. Anschließend werden die ermittelten Signalflächen mit der relativen Häufigkeit des Isotops ins Verhältnis gesetzt. Bei Übereinstimmung zwischen der Messung und den tabellierten Werten kann von einer interferenzfreien Messung ausgegangen werden.

In der nachstehenden Tabelle 17 sind die Messergebnisse der Isotope ^{64}Zn und ^{66}Zn der Kalibration, sowie die tabellierten und berechneten Daten aufgelistet.

Die aus den LA-ICP-MS Messwerten berechneten relativen Häufigkeiten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Literaturwert von 27.98 %. Somit kann von einer interferenzfreien Zinkanalytik ausgegangen werden.

Tabelle 17: Bestimmung der relativen Häufigkeit aus den LA-ICP-MS Messwerten

c (Zn) [ppm]	^{64}Zn [cps]	^{66}Zn [cps]	Rel. Häufigkeit [%] ²	Berechnete rel. Häufigkeit [%]
0,05	2278,02	1165,25	27.98	24,86±4,92
0,50	10892,76	6188,85	27.98	27,61±5,06
1,00	30285,52	17778,96	27.98	28,53±4,87
10,00	285395,49	159140,29	27.98	27,10±4,79
50,00	1226263,19	718497,03	27.98	28,48±5,13

² J.S. Becker, *Inorganic mass spectroscopy – Principles and applications*, Jonh Wiley & Sons, Chichester, 2007

4.3 Korrelation der orts aufgelösten Zinkverteilung und der H&E gefärbten Krebszellen des Mammakarzinoms

Das Element Zink spielt als aktives Zentrum in Proteinen, Enzymen, Rezeptoren, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Funktionen. In diesem Zusammenhang sind besonders die Superoxiddismutase (SOD), welche die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützt, und das p53-Protein, welches an Reparaturmechanismen der DNA beteiligt ist, zu nennen (Kap. 2.1.5).

Aufgrund der vielen Aktivitäten des Zinks in unterschiedlichen Zellvorgängen, wurden verschiedene Theorien bezüglich des Einflusses auf die Mammakarzinogenese entwickelt.

Neben Untersuchungen von Vollblut, Blutserum, Blutplasma, Haaren und Fußnägeln, die zu stark variierenden Ergebnissen hinsichtlich der Zinkkonzentration führten, wurden seit Mitte 1980 vermehrt Gewebeprobe von Brustkrebspatientinnen analysiert [RAJU *et al.* 2006, RIZK *et al.* 1984].

In den folgenden Jahren und speziell in den letzten zehn Jahren wurden Mammakarzinome intensiver auf das Element Zink untersucht. Diese Analysen erfolgten fast ausschließlich mit röntgenbasierten Methoden wie z.B. der Synchrotron-Röntgenfluoreszenzanalysen (SRXRF = synchrotron X-ray fluorescence spectroscopy) oder der energiedispersiven Röntgenfluoreszenzspektroskopie mit Röntgenstrahlanregung (EDRFA = energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy) [GERAKI *et al.* 2004, MAJEWSKA *et al.* 2007].

Erstmalig wird in diesem Forschungsgebiet die LA-ICP-MS Analyse eingesetzt, um die orts aufgelöste Zinkverteilung in Mammakarzinomen zu bestimmen und mit dem Gradingssystem nach Elston und Ellis [ELSTON UND ELLIS 1991] zu korrelieren.

4.3.1 Korrelation der Zinkkonzentrationen und dem Tumorgrading nach Elston und Ellis

Das Ergebnis einer Vielzahl von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an Mammakarzinomen ist, dass die Zinkkonzentration in dem Tumorgewebe gegenüber dem nicht infiltrierten, oft als „normal tissue“ deklarierten Gewebe erhöht ist [GERAKI *et al.* 2002 und 2004, RAJU *et al.* 2006, MAGALHAES *et al.* 2006 und 2010, FARQUAHARSON *et al.* 2008 und 2009].

Bei vielen dieser Analysen wurden Gewebeproben verwendet, welche in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Durch die Wechselwirkung der gepufferten Formaldehydlösung mit den Proteinen tritt eine Vernetzung dieser ein, wodurch die meisten ihre physiologische Funktion verlieren. Da es sich um wässrige Lösungen handelt, werden z.B. Glykogen, Polysaccharide und Urate aus dem Gewebe herausgelöst [CHAURAND *et al.* 2008]. Eine Beeinflussung der Metallkonzentration im Gewebe kann nicht ausgeschlossen werden.

Außerdem ist zu erwähnen, dass bei fast allen Untersuchungen Gesamtmetallbestimmungen durchgeführt wurden, wodurch lediglich der Vergleich zwischen Krebs- und krebszellfreiem Gewebe erfolgen konnte.

4.3.1.1 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten invasiv duktalem G1 Mammakarzinom

Die Korrelationsanalyse erfolgt wie in Kapitel 3.5 (S.70) beschrieben mittels paralleler Gewebeschnitte, welche eine Schichtdicke von 10 µm aufweisen. Die H&E Färbung, sowie die anschließende histologische Klassifizierung anhand der glandulären Differenzierung, der Kernpolymorphie und der Mitosezahl pro definierte Fläche, wurden von Prof. Dr. Bankfalvi durchgeführt.

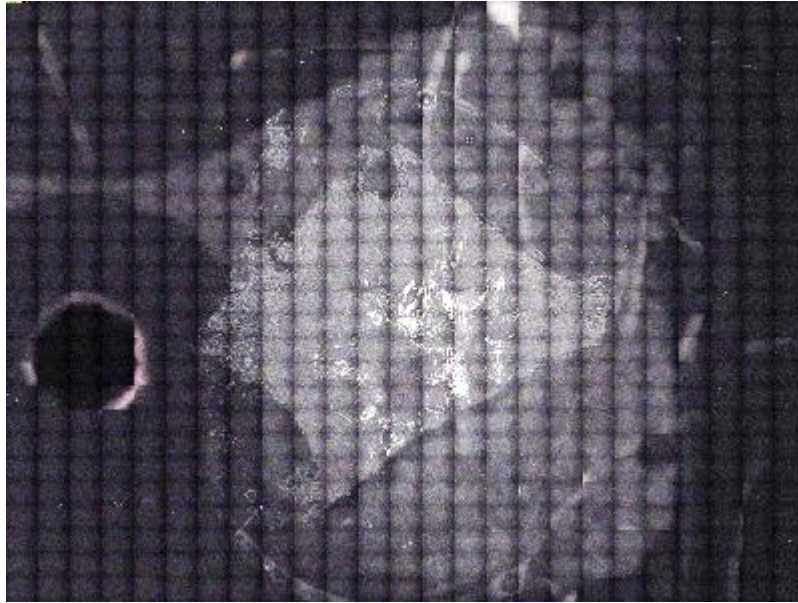


Abbildung 33: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

In Abbildung 33 ist die CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms zu sehen. Die Kästchenstruktur der Aufnahme resultiert aus der Kameraoptik der Laserablationsapparatur. Im Zentrum der Abbildung ist der Gewebeschnitt zu erkennen, welcher von dem Einbettmedium umgeben ist. Dieses wird benötigt um den Gewebeblock beim Schneideprozess zu fixieren. Bei den hell weißen Bereichen innerhalb des Gewebeschnittes handelt es sich um verkalktes Gewebe.

Die Kongruenz der Kameraaufnahme und des Zink-Konturplots (Abbildung 34) ist sehr gut, so dass die anschließende Korrelationsanalyse des H&E gefärbten Schnittes mit den orts aufgelösten Elementinformationen durchgeführt werden kann.

Die verwendeten Messparameter für die orts aufgelöste Elementanalyse sind Kapitel 3.3.4 (Tabelle 13, S.67) zu entnehmen.

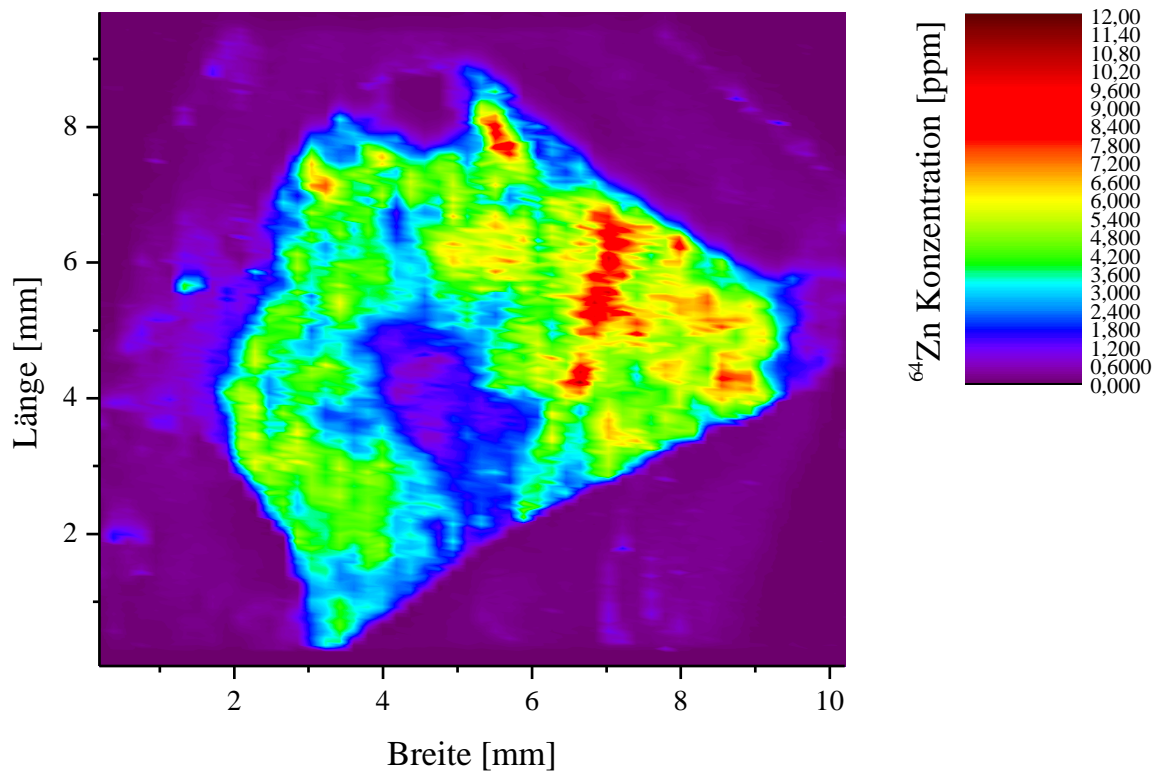


Abbildung 34: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

Der Zink-Konturplot zeigt deutlich eine inhomogene Verteilung innerhalb des Gewebes. Während ein großer Teil des Gewebes eine Zinkkonzentration von 4,0-6,0 ppm aufweist, sind ebenfalls Regionen mit 8,0-9,6 ppm detektiert worden.

In dem mit H&E gefärbten Mammakarzinomschnitt in Abbildung 35 sind die infiltrierend ins Stroma gewachsenen Krebszellen dunkel blau bis violett gefärbt. Die hellroten Bereiche stellen das Stroma dar, welches aus Fett und Bindegewebe besteht. Alle in dieser Arbeit abgebildeten H&E gefärbten mikroskopischen Aufnahmen sind mit einer 200-fachen Vergrößerung erstellt worden.

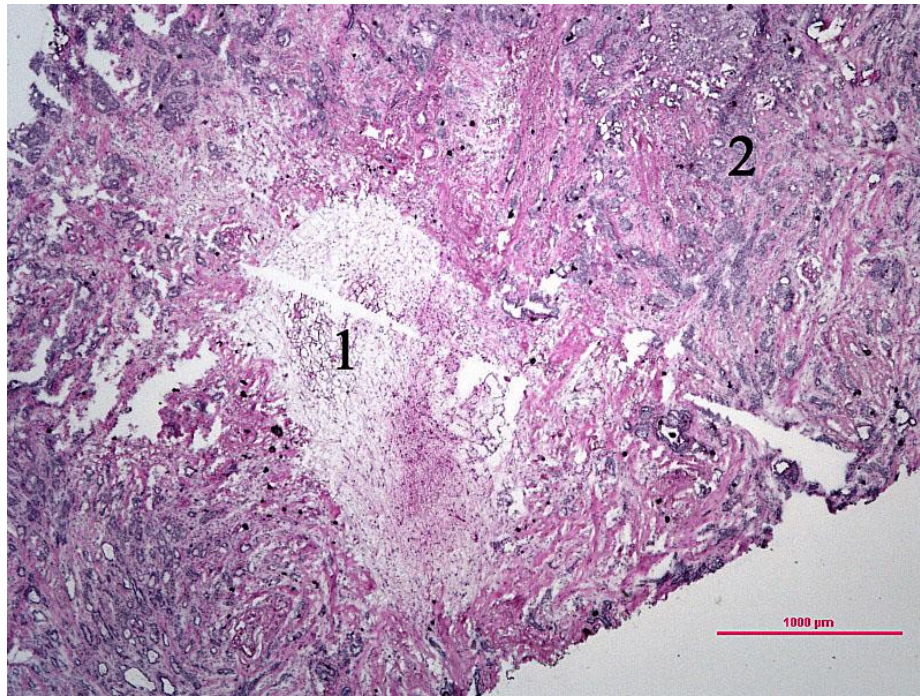


Abbildung 35: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktaler G1 Mammakarzinomschnitt

Bei der Korrelation zwischen den gut differenzierten Krebszellen und der Zinkkonzentration ist deutlich zu erkennen, dass in Bereich 1 von Abbildung 35 keine Krebszellen detektiert worden sind. Demgegenüber zeigt sich im Bereich 2 eine clusterartige Ansammlung von Krebszellen. Die Korrelationsanalyse des H&E gefärbten Gewebes (Abbildung 35) und des Zink Konturplotausschnittes (Abbildung 36) zeigt, dass im Bereich 1 die Zinkkonzentration niedriger als 2 ppm ist, während im Bereich 2, in dem sehr viele Krebszellen vorhanden sind die Zinkkonzentration bei 8,0-9,6 ppm liegt. Auch die an Bereich 1 angrenzenden Zellverbände weisen Krebszellen auf. Dies lässt sich im Zinkkonturplot mit einem Anstieg der Zinkkonzentration korrelieren.

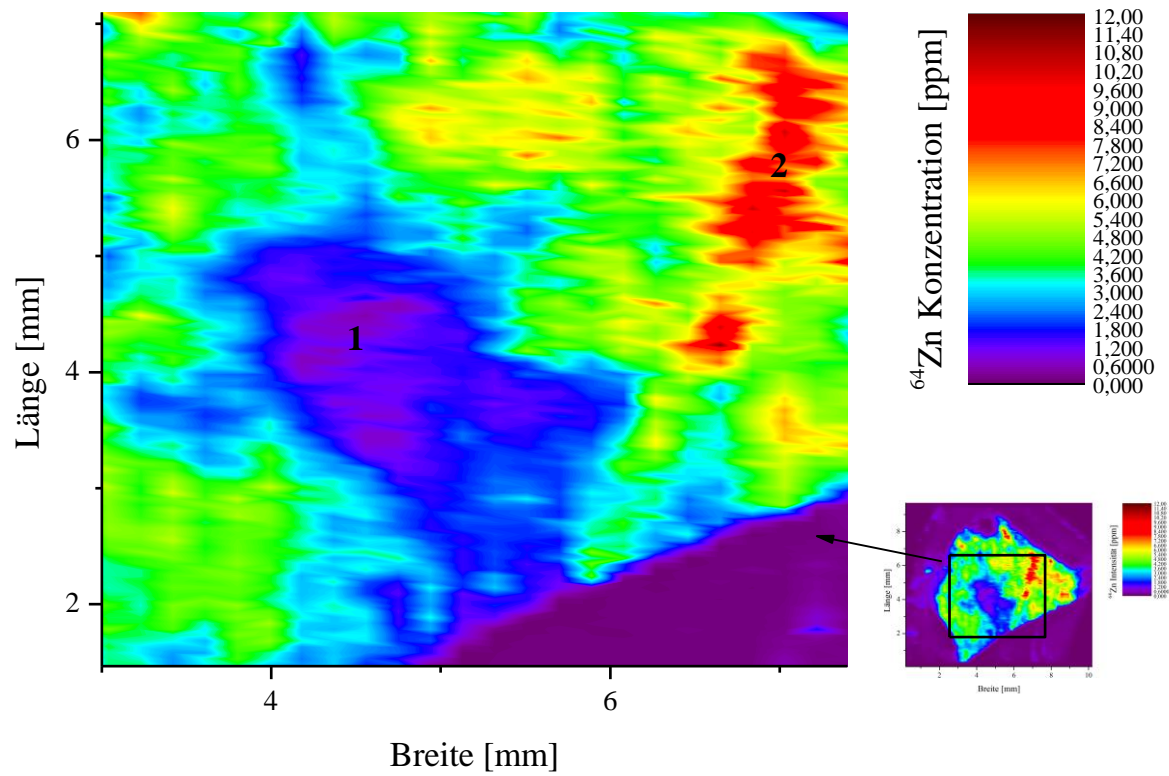


Abbildung 36: Ausschnitt des Zink-Konturplots eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

4.3.1.2 Korrelation der Zinkkonzentrationen und dem H&E gefärbten invasiv duktalem G2 Mammakarzinom

Für die Korrelation zwischen der Zinkkonzentration und dem invasiv duktalem G2 Mammakarzinom werden ebenfalls Parallelschnitte angefertigt, von denen einer mittels H&E gefärbt und anschließend pathologisch analysiert wird, während der zweite Schnitt mit der LA-ICP-MS untersucht wird.

In Abbildung 37 ist die CCD-Kameraaufnahme des invasiv duktalem G2 Mammakarzinoms zu sehen. Die Konturen der Kameraaufnahme mit der orts aufgelösten Zinkanalyse (Abbildung 38) sind kongruent.



Abbildung 37: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktalem G2 Mammakarzinoms

Die Zinkverteilung innerhalb des Mammakarzinomgewebes ist, wie auch schon bei dem G1 Karzinom, sehr inhomogen. Außerhalb der Bereiche der Konzentrationsmaxima, liegt die Zinkkonzentration hier ebenfalls in einem Bereich zwischen 5,0–6,0 ppm, während die sogenannten „hot spots“ Konzentrationen zwischen 12,6–14,4 ppm aufweisen.

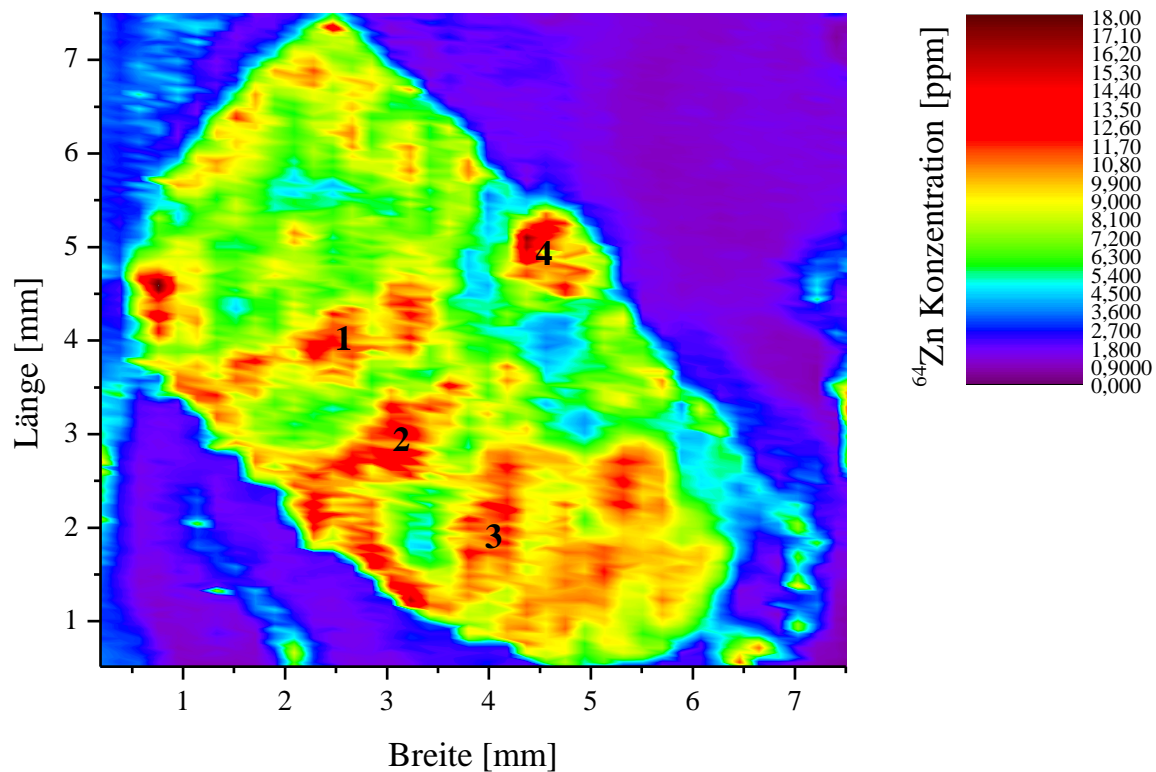


Abbildung 38: Zink-Konturplot eines invasiv duktalem G2 Mammakarzinoms

Die H&E Färbung des ID G2 Mammakarzinoms zeigt, dass große Bereiche des Gewebes mit Krebszellen durchsetzt sind. Die Bereiche eins, zwei und drei weisen vollständig entartete Zellverbände auf.

Bei der Korrelationsanalyse der orts aufgelösten Elementverteilung (Abbildung 38) und der lila gefärbten Krebszellen (Abbildung 39) ist eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den deutlich erhöhten Zinkkonzentrationen, mit 12,6-14,4 ppm und den entarteten Zellen zu erkennen. Die Bereiche eins, zwei und drei sind vollständig kongruent. Die Abgrenzung der Krebszellverbände erfolgt durch das Stroma, was ebenfalls in dem Konturplot durch einen Zinkkonzentrationsbereich 6,3-7,2 ppm zu sehen ist.

Außerdem ist im Bereich 4 eine erhöhte Zinkkonzentration zu verzeichnen, welche in diesem Fall keine Korrelation zu einer Ansammlung von Krebszellen besitzt. Anhand der pathologischen Analyse handelt es sich bei diesem Bereich um ein Blutgefäß, wie z.B. eine Vene oder eine Arterie. In diesem Fall wurde wahrscheinlich das im Blut gebundene Zink detektiert.

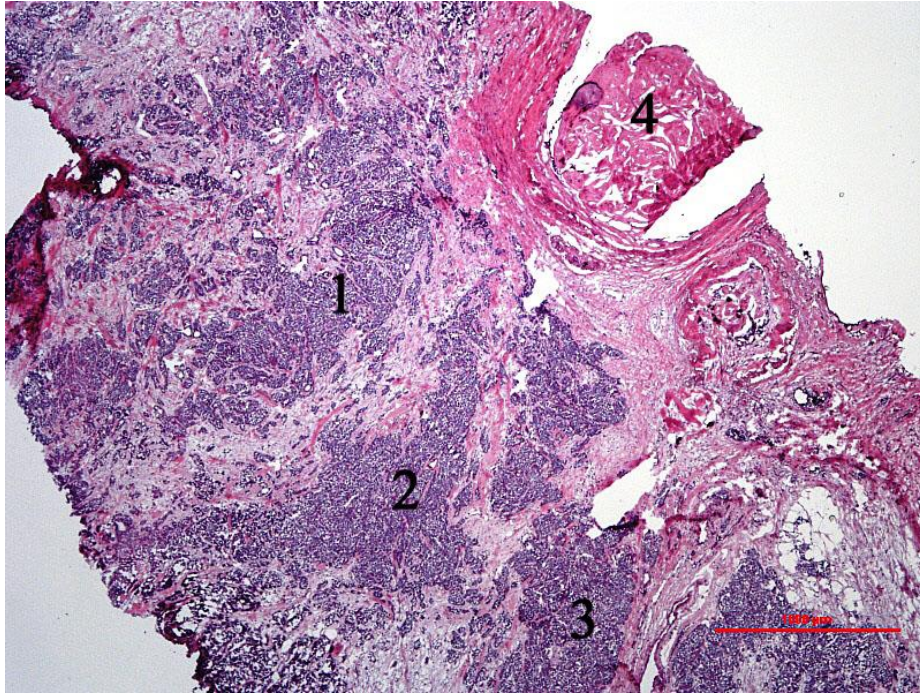


Abbildung 39: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktaler G2 Mammakarzinomschnitt

4.3.1.3 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten invasiv duktalen G3 Mammakarzinom

Im ersten Schritt der Korrelationsanalyse wird die Kontur der CCD-Kameraaufnahme mit dem Analysenergebnis der orts aufgelösten Elementanalyse verglichen.

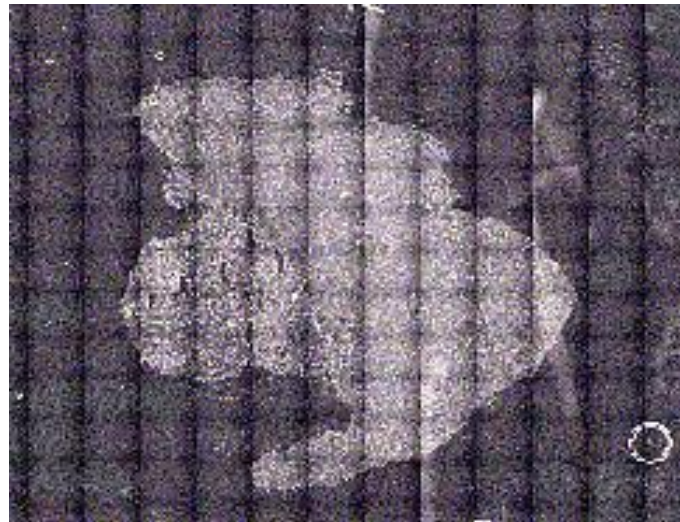


Abbildung 40: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktalen G3 Mammakarzinoms

Bei der photographischen Aufnahme (Abbildung 40) stellt die helle nierenartige Form das Gewebe dar, welches im Konturvergleich mit dem Ergebnis der LA-ICP-MS (Abbildung 41) sehr gut übereinstimmt.

Der Unterschied, dass der Gewebeschnitt eine zusammenhängende Fläche aufweist, während im Konturplot zwei voneinander getrennte Flächen abgebildet sind, ist damit zu begründen, dass in dem Zwischenbereich das Einbettmedium vorliegt. In diesem Bereich wird eine geringere Zinkkonzentration detektiert. Dies lässt sich durch die Aufnahme des H&E gefärbten Gewebeschnitts (Abbildung 42) bestätigen, bei dem in diesem Bereich aufgrund keiner Zellfärbung ebenfalls keine geschlossene Gewebefläche vorhanden ist.

Der Zink Konturplot zeigt, wie auch schon in der Analyse des G1 und G2 Karzinoms, ebenfalls wieder eine inhomogene Verteilung. Innerhalb einiger Bereiche liegt die Zinkkonzentration bei 7,2-8,4 ppm. Die lokalen Konzentrationsmaxima weisen Messwerte von 18,0-20,4 ppm auf.

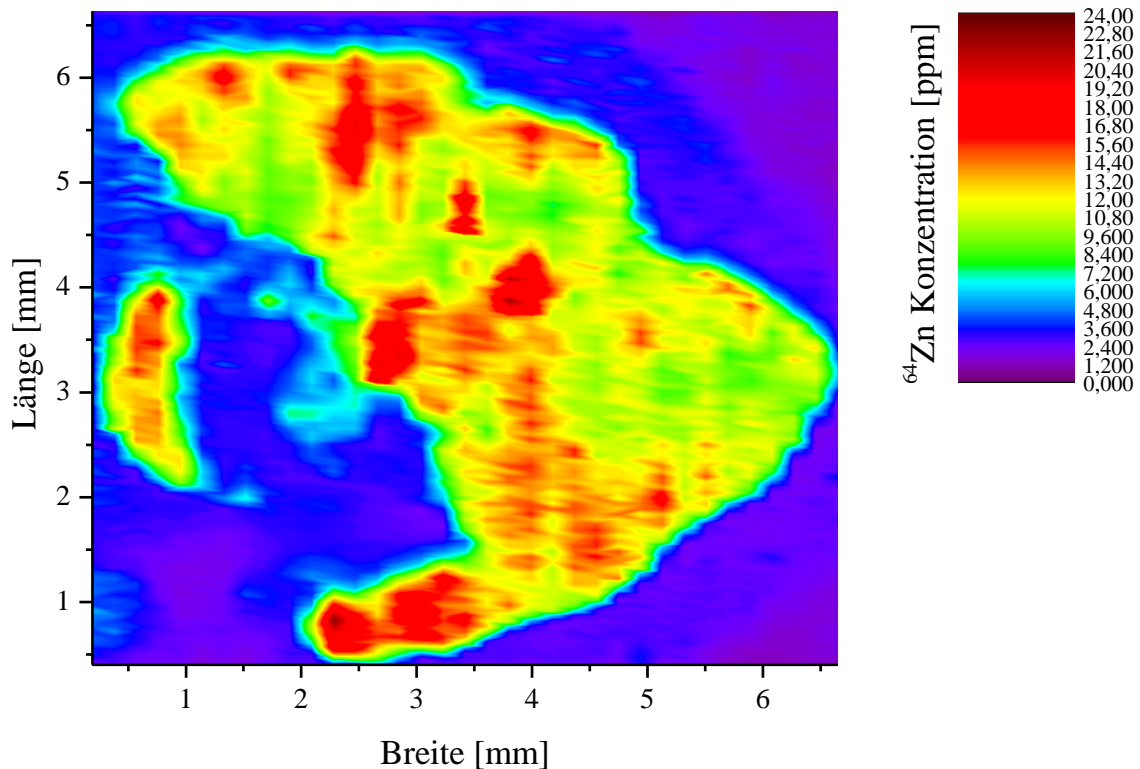


Abbildung 41: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Der H&E gefärbte Karzinomprobe zeigt (Abbildung 42), dass das Gewebe vollständig von Krebszellen infiltriert ist. Es sind lediglich kleine Bereiche des rötlich gefärbten Stromas zu erkennen, welche gänzlich von entarteten Zellen umgeben sind.

Im Bereich 1 (Abbildung 42, Abbildung 43) wird durch die histologische Untersuchung aufgrund der dunkelblauen Färbung eine hohe Krebszellenakkumulation detektiert. Bei der Korrelationsanalyse mit dem Zink-Konturplot ist im Bereich 1 mit 18,0-20,6 ppm eine sehr hohe Zinkkonzentration ermittelt worden.

Für das rot gefärbte Stroma im Bereich 2 ist mit 7,2-8,4 ppm eine deutlich niedrigere Zinkkonzentration mit dem LA-ICP-MS detektiert worden.

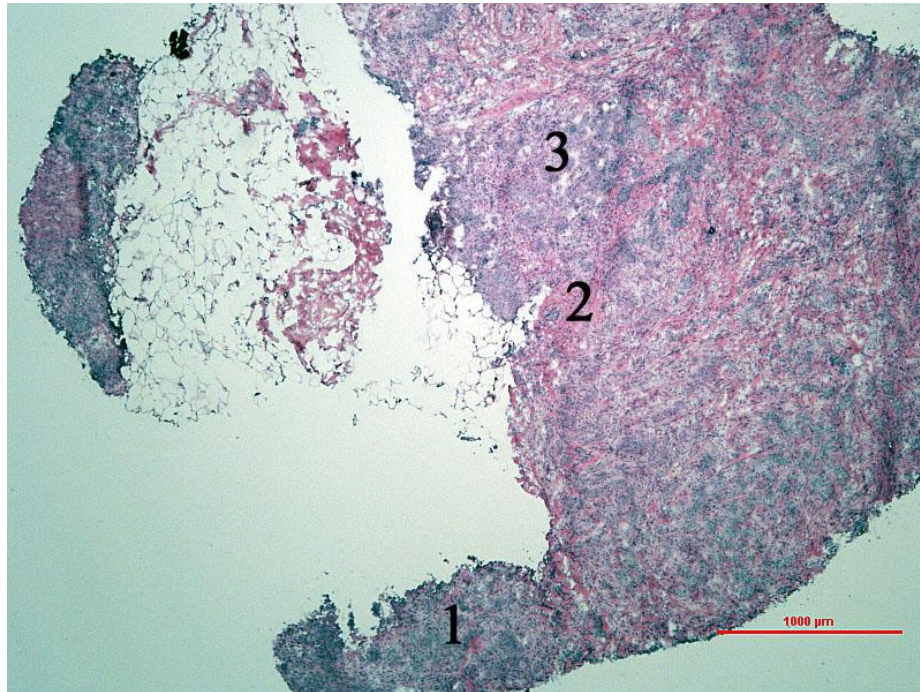


Abbildung 42: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktaler G3 Mammakarzinomschnitt

Die Korrelation dieser beiden Bereiche zeigt eine klare Abgrenzung von den angrenzenden Krebszellbereichen.

Im Bereich 3 sind mittels der histologischen Analyse Krebszellen detektiert worden. In diesem Bereich ist mittels der orts aufgelösten Elementanalytik eine ähnlich hohe Zinkkonzentration wie im Bereich 1 bestimmt worden.

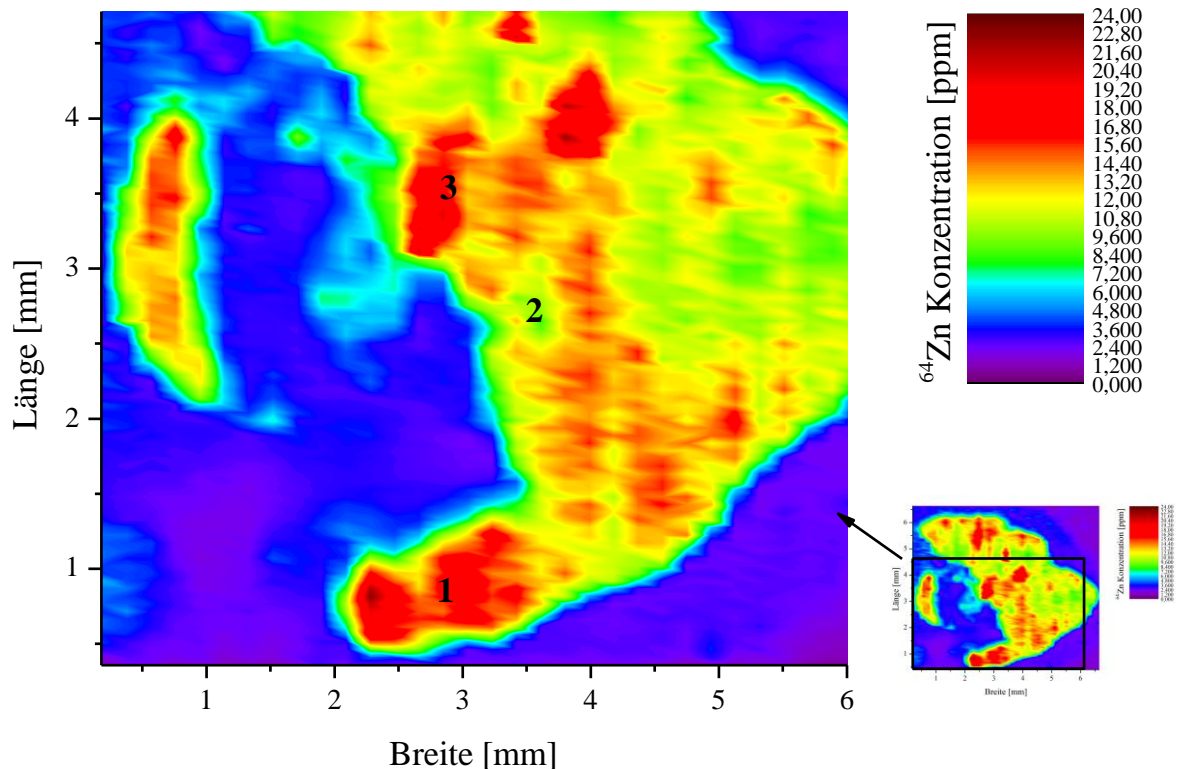


Abbildung 43: Ausschnitt eines Zink-Konturplots eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Es konnte somit in allen invasiv duktales Mammakarzinomen mit Gradingfaktoren von eins bis drei, eine sehr gute Korrelation zwischen den H&E gefärbten Krebszellen und der Zinkkonzentration aufgezeigt werden. Eine Differenzierung zwischen Stroma- und Krebszellgewebe ist mit der orts aufgelösten Elementanalytik möglich.

Außerdem konnte eine Zunahme der korrelierten Zinkkonzentration mit steigenden prognostischen Gradingfaktor ermittelt werden.

4.3.1.4 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten lobulären und duktales Mammakarzinom

In einer histopathologischen Untersuchung kann nach einer H&E Färbung bereits aufgrund des Krebszellwachstums zwischen den infiltrierenden und diffusen Wachstum eines invasiv-lobulären Karzinoms und dem kohäsiven und soliden Zellverbänden eines duktales Mammakarzinoms differenziert werden.

Der Grund hierfür ist der Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin (Kapitel 2.1.3, S.12).

Die Kongruenz der Gewebes in der CCD-Kameraaufnahme (Abbildung 44) und des Zink-Konturplots (Abbildung 45) liegt vor, so dass die Grundbedingung für die anschließende Korrelationsanalyse gegeben ist. Die beiden weißen Streifen in der rechten Bildhälfte sind auf mechanische Einwirkungen auf der Objektträgerrückseite zurückzuführen. Der kleine Kreis resultiert aus dem Lufteinschluss während des Einbettprozesses.



Abbildung 44: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

Erneut zeigt die orts aufgelöste Analyse des Elements Zinks eine inhomogene Verteilung. In den Bereichen 1 und 2 liegt die Zinkkonzentration zwischen 8,4-9,1 ppm, während in Bereich 3 mit 3,90-5,20 ppm eine niedrigere Konzentration ermittelt wurde.

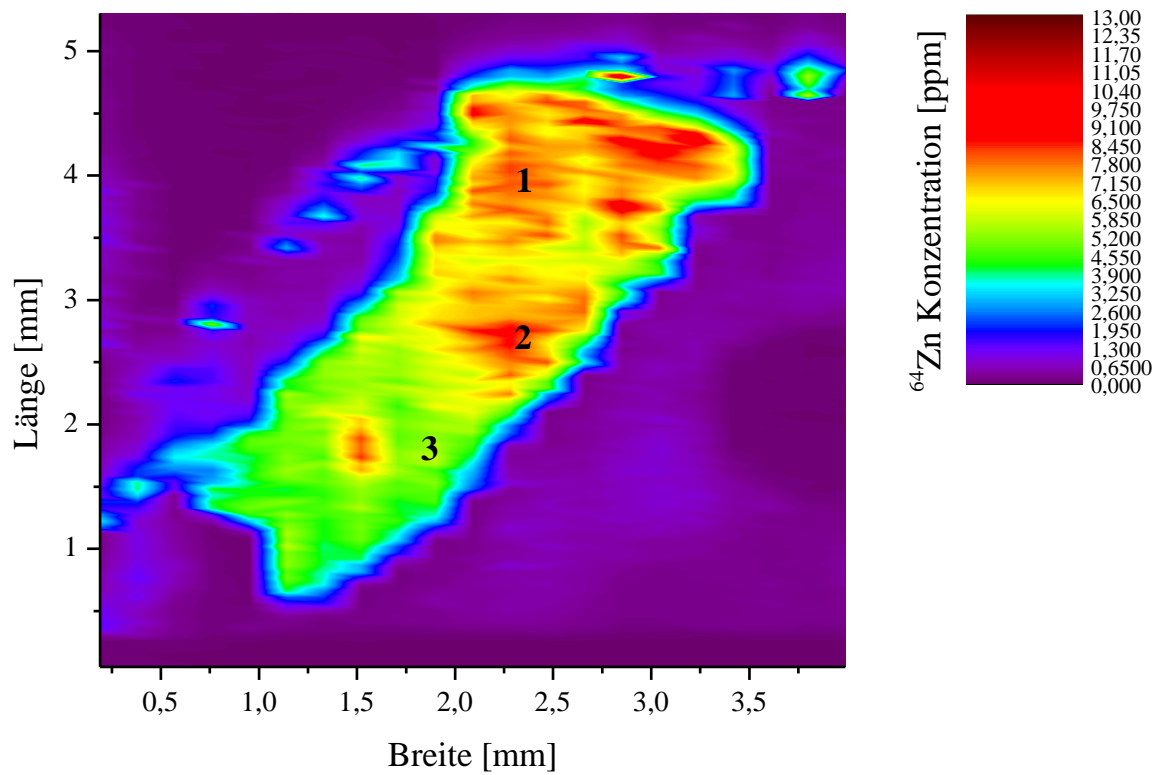


Abbildung 45: Zink-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

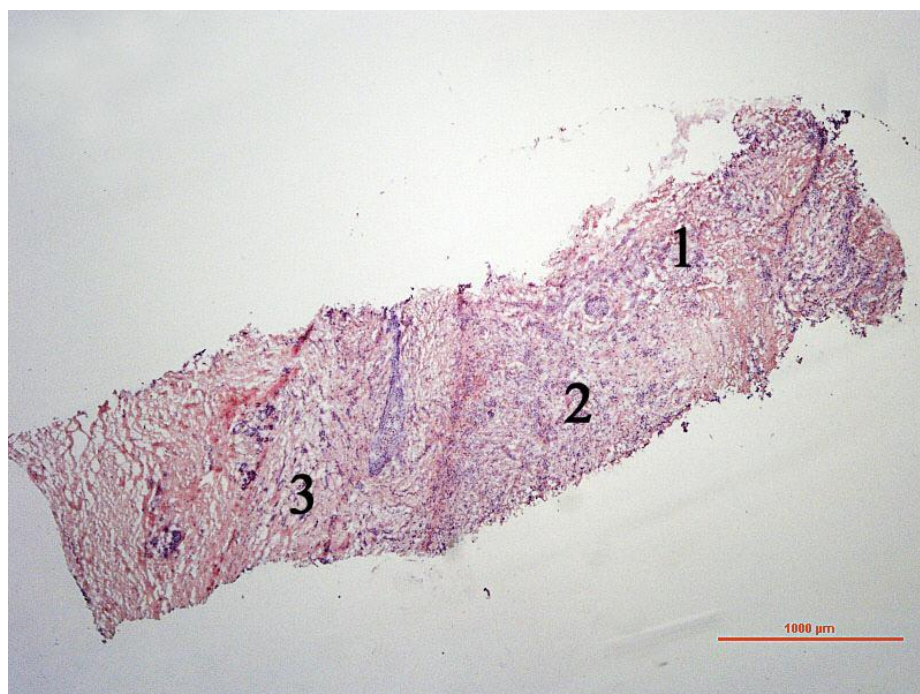


Abbildung 46: Ein mit H&E gefärbter invasiv lobulärer G2 Mammakarzinomschnitt

Bei der Korrelationsanalyse zwischen dem H&E gefärbten Gewebe (Abbildung 46) und dem Zink Konturplot ist zu sehen, dass in Bereiche 1 und 2 sowohl Tumorzellen vorhanden sind als auch höhere Zinkkonzentrationen detektiert wurden. Im Gegensatz dazu ist in Bereich 3 eine geringere Zinkkonzentration ermittelt worden und in der histologischen Färbung sind auch keine Krebszellen zu erkennen.

Bei dem invasiv duktalem G2 Mammakarzinom sind die Konturen der CCD Kameraaufnahme (Abbildung 47) und des Zink-Konturplots (Abbildung 48) ebenfalls kongruent. Bei dem dunklen Kreis in der linken Bildhälfte der Kameraaufnahme handelt es sich um eine Öffnung in dem Peltierelement der Ablationskammer.

Des Weiteren ist eine inhomogene Verteilung der Zinkkonzentration zuerkennen, in der einige Bereiche Konzentrationen von 5,70-7,60 ppm und andere von 11,40-14,25 ppm aufweisen.

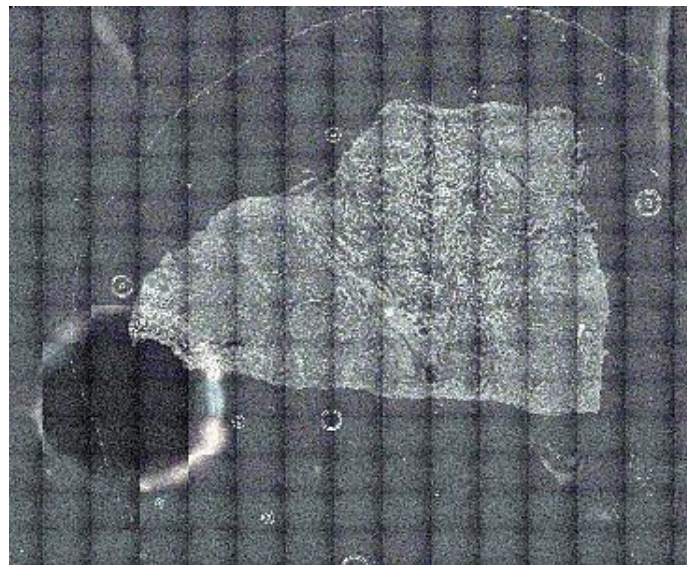


Abbildung 47: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktalem G2 Mammakarzinoms

Die Korrelation der maximalen Zinkkonzentrationen (Abbildung 50, Bereich 1 und 2) mit den blau-lila gefärbten Krebszellen (Abbildung 49, Bereich 1 und 2) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Im Bereich 3 beider Abbildungen sind

nach der H&E Färbung keine Krebszellen und eine geringer Zinkkonzentration detektiert worden.

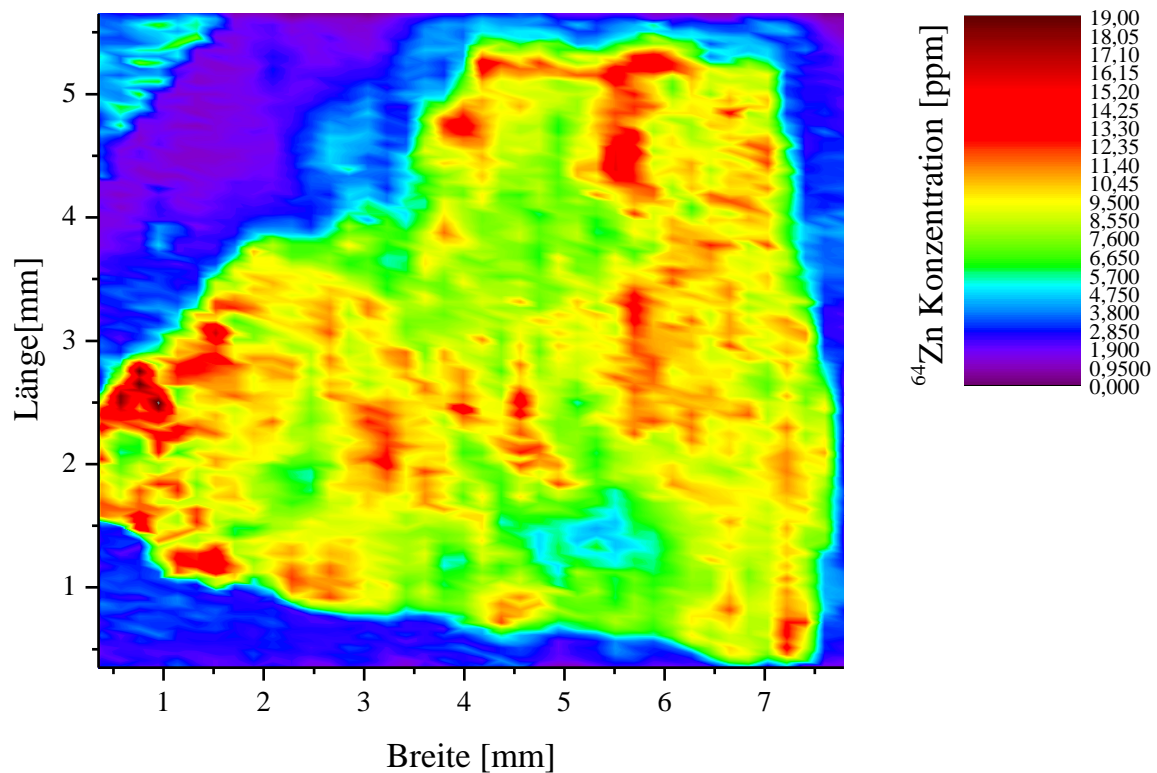


Abbildung 48: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

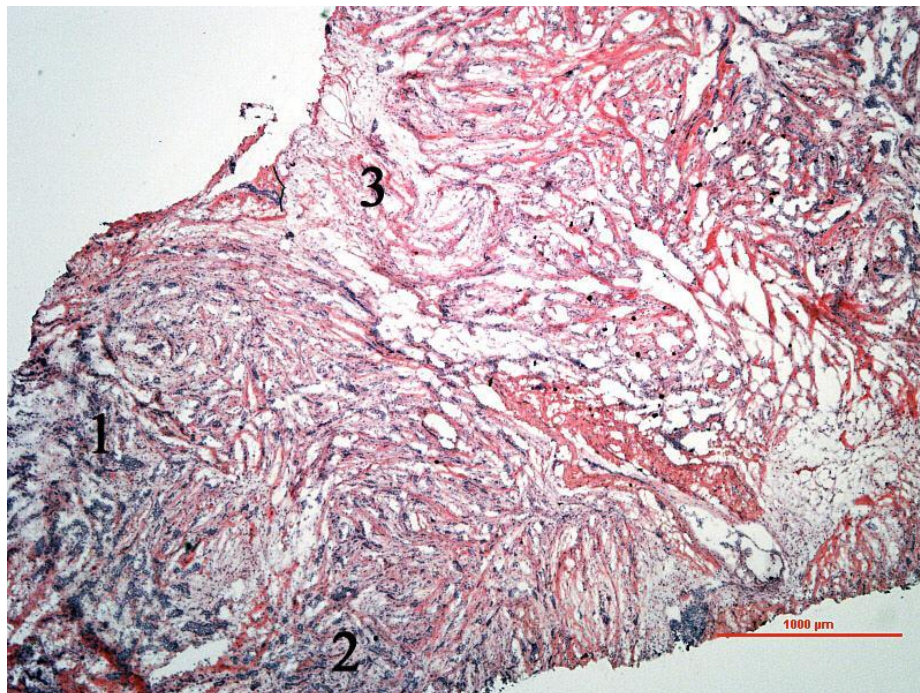


Abbildung 49: Ein mit H&E gefärbter invasiv lobulärer G2 Mammakarzinomschnitt

In diesem Bereich des Gewebes liegt das Stroma vor. Nachdem der Nachweis über die identische lokale Zink- und Krebszellenverteilung erbracht worden ist, können diese Bereiche hinsichtlich der Mammakarzinomsubtypen verglichen werden.

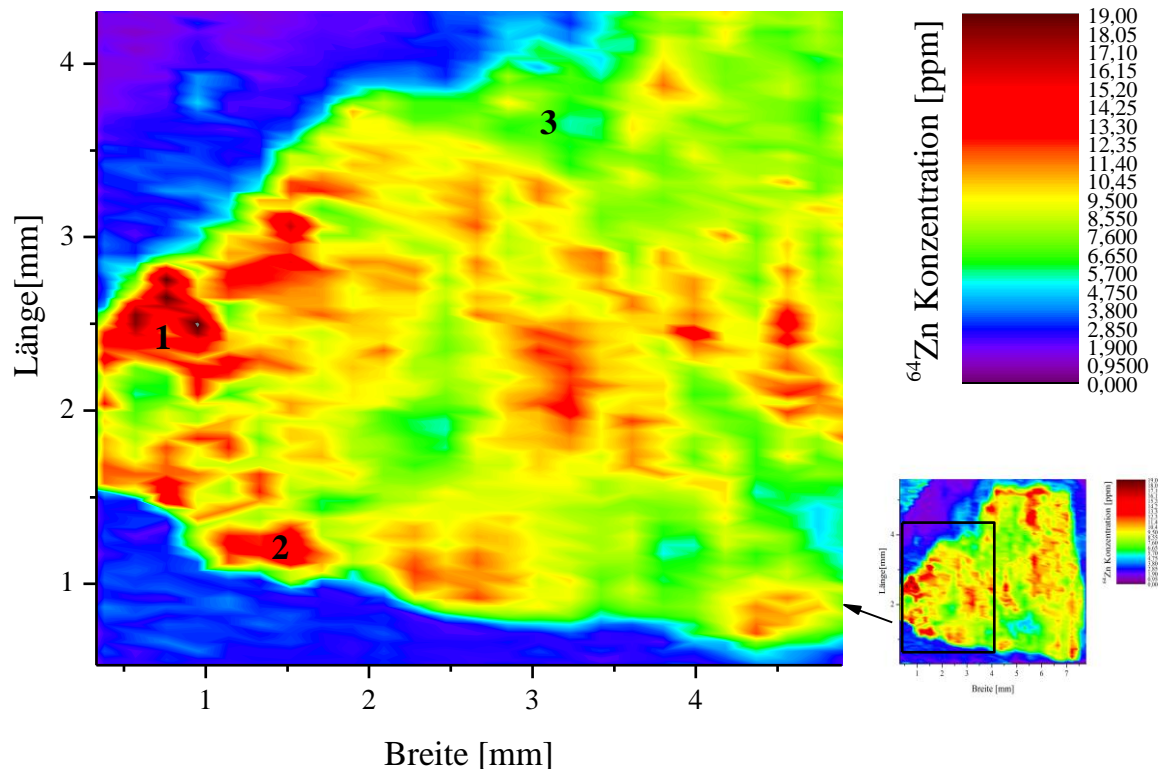


Abbildung 50: Zink-Konturplotausschnitt eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

Die fadenartige Aneinanderreihung der Krebszellen des lobulären Mammakarzinoms lässt sich aufgrund der sehr kleinen Dimensionen mit der LA-ICP-MS nicht auflösen. Es zeigt sich jedoch ein deutlicher Zinkkonzentrationsunterschied der korrelierten Karzinombereiche zwischen dem lobulären und dem duktales Tumorgewebe. Während die lobulären Krebszellen einen Konzentrationsbereich zwischen 8,45-9,75 ppm aufweisen, liegen die Zinkkonzentration in den duktales Krebszellen bei 11,40-14,25 ppm. Somit zeigt sich, dass bei gleichem Grading anhand der Zinkkonzentration eine

Differenzierung zwischen einem lobulären und duktalem Mammakarzinom durchgeführt werden kann.

4.3.1.5 Korrelation der Zinkkonzentration und dem H&E gefärbten duktalem und duktalem „in-situ“ Mammakarzinom

Nach der WHO Klassifikation unterscheidet man zwischen dem invasiv-duktalem Karzinom und dem nicht-invasiven Karzinom. In diesen Fällen spricht man vom sogenannten intraduktalen Mammakarzinom oder von dem duktalem Karzinom in-situ (DCIS = ductal carcinoma in-situ). Aus der Bezeichnung DCIS geht hervor, dass sich die Krebszellen noch in den Brustdrüsengängen befinden und noch nicht in das umgebende Gewebe eingedrungen sind.

Laut Böcker und Decker [BÖCKER UND DECKER 2008] lassen sich in über 80 % der invasiven Karzinome In-situ-Komponenten nachweisen. Um den Einfluss des Karzinomsubtypen auf die Zinkkonzentration zu untersuchen, wird ein ID G3 und einem ID G3 mit DCIS G3 Anteilen im Karzinom mit einander verglichen.

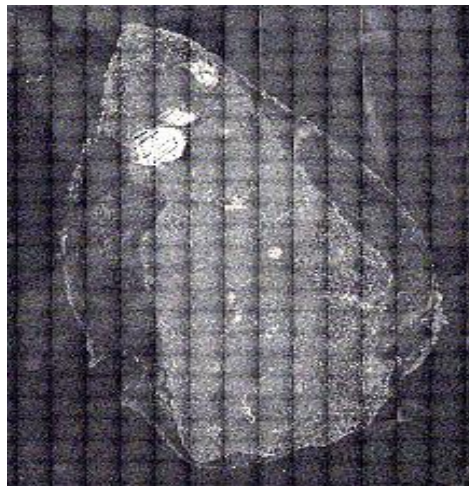


Abbildung 51: CCD-Kameraaufnahme eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3

Die Kontur des LA-ICP-MS Messergebnisses zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit der CCD Kameraaufnahme des Karzinoms.

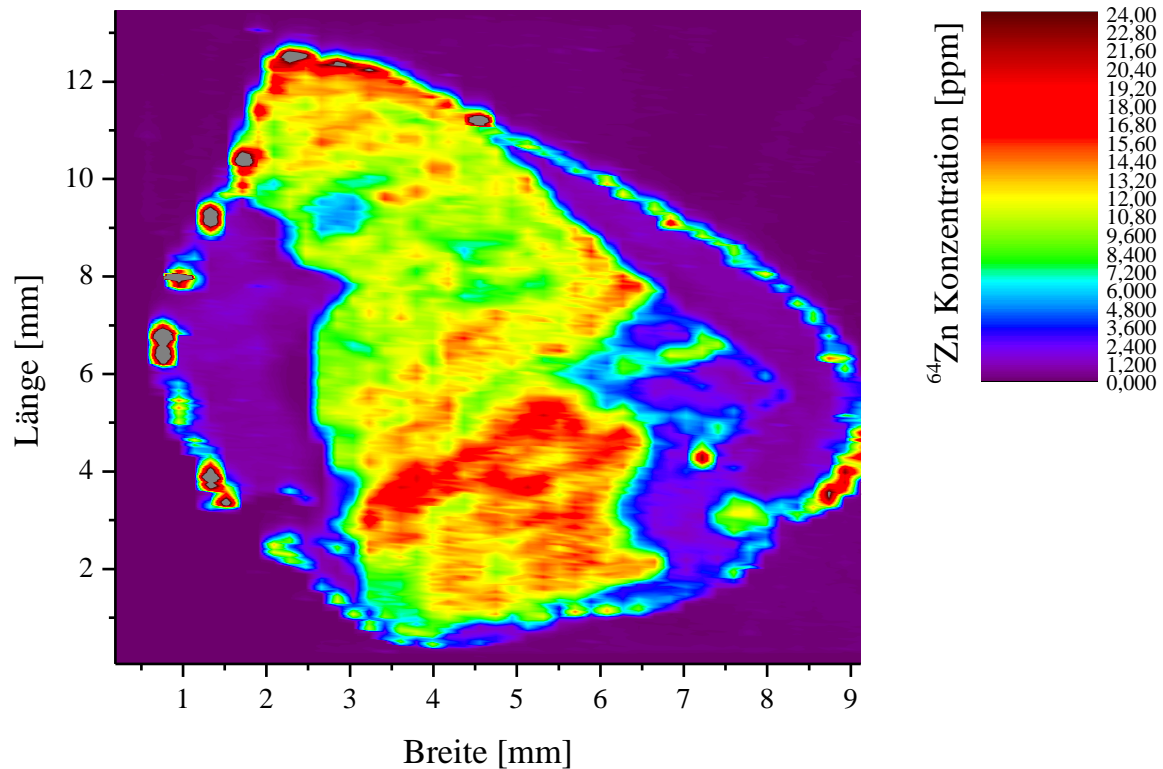


Abbildung 52: Zinkkonturplot eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3

Die äußere linienförmige, den Gewebeschnitt einschließende Abgrenzung ist dem Einbettmedium zuzuordnen. Wie dem Konturplot zu entnehmen ist, liegen die detektierten Konzentrationen bei teilweise über 20,0 ppm. Hier kann es sich um eine Kontamination handeln, welche bei der Probenvorbereitung hervorgerufen worden ist. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass sich durch die auf den Gewebeblock wirkenden Scherkräfte am Rand der Probe zu einer Komprimierung des Gewebes kommt und dadurch die Schichtdicke gegenüber dem restlichen Schnitt erhöht ist.

Der Zink-Konturplot zeigt jedoch, dass die Konzentration in den Bereichen zwischen dem Karzinomgewebe und dem äußeren Rand der Probe identische Messwerte wie für den restlichen Hintergrund der Probe detektiert werden. Außerdem zeigen die CCD-Kameraaufnahme, der Konturplot sowie die fotografische Abbildung des H&E gefärbten Karzinoms eine sehr gute Übereinstimmung der Gewebekonturen.

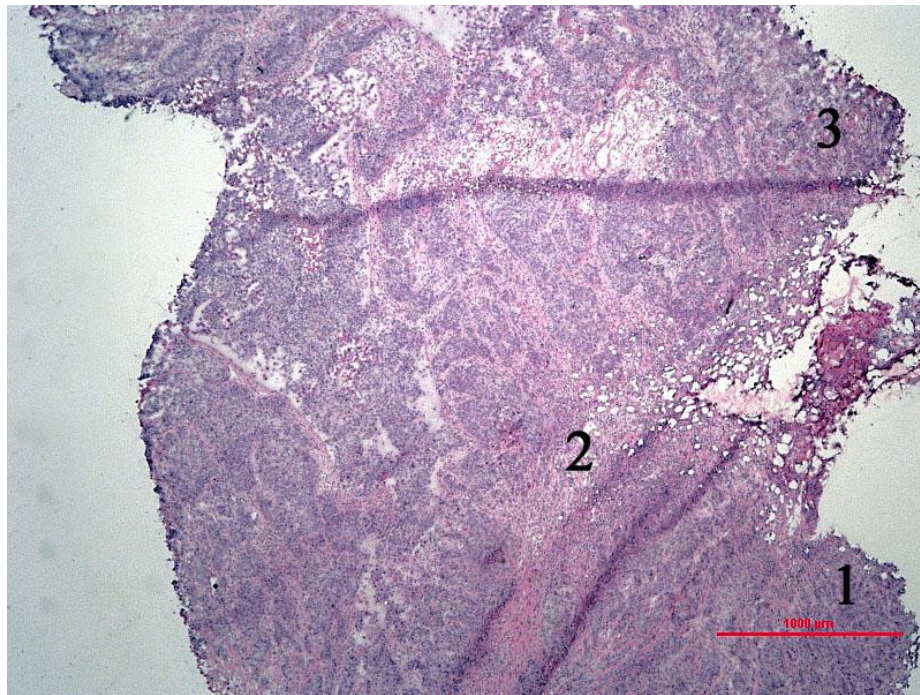


Abbildung 53: Ein mit H&E gefärbter eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3

Das duktales in-situ Mammakarzinom zeigt eine inhomogene Verteilung der Zinkkonzentration, welche hinsichtlich der maximalen Konzentrationsbereiche sehr gut mit den lila gefärbten Krebszellen korreliert.

In den Bereichen eins und drei sind in Abbildung 53 eine hohe Krebszelldichte und in Abbildung 54 eine Zinkkonzentration von 16,8-18,0 ppm zu erkennen, während der Bereich zwei das rot gefärbte Stroma eine Zinkkonzentration von 7,2-8,4 ppm aufweist.

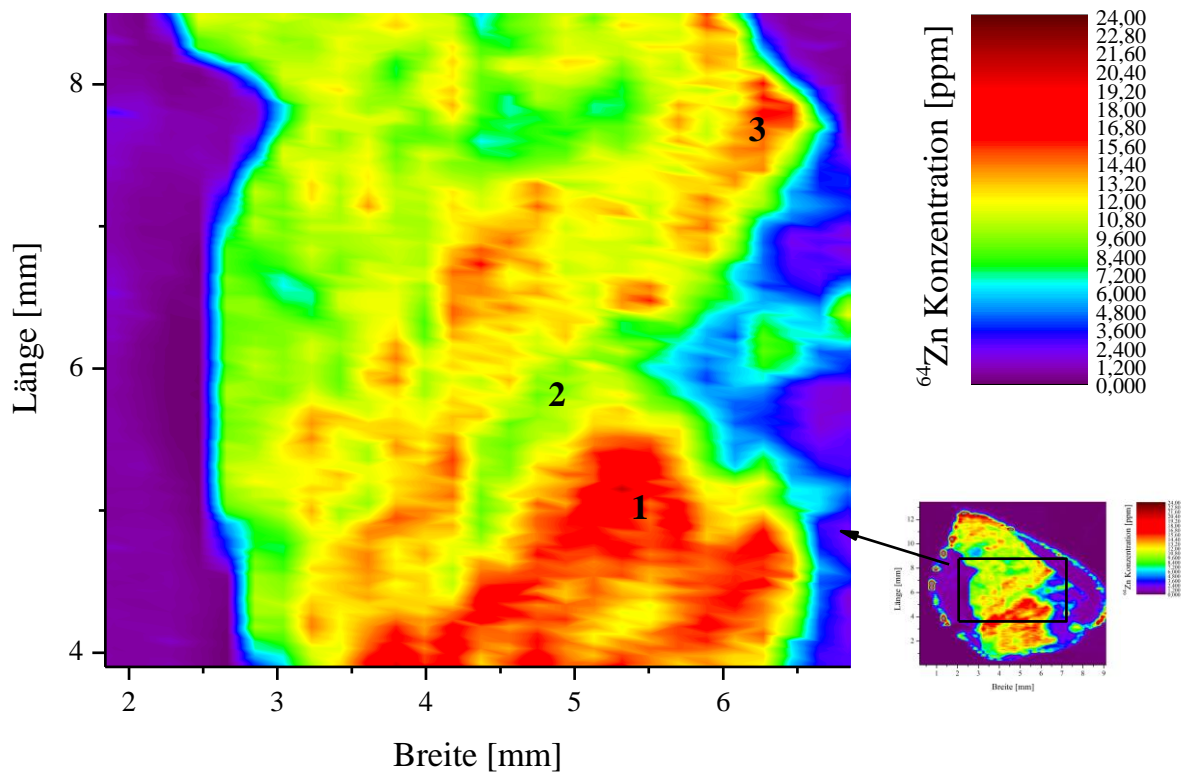


Abbildung 54: Zink-Konturplotausschnitt eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3

Für den Vergleich wird das invasiv duktales Mammakarzinom aus Kapitel 4.3.1.3 herangezogen. Die Kongruenz der CCD-Kameraabbildung (Abbildung 55) und des Zinkkonturplots des invasiv duktales G3 Karzinoms (Abbildung 56) hinsichtlich der Kontur ist, wie auch die Korrelation der Krebszellen und der Zinkkonzentration sehr gut.

Weitere Beschreibungen sind Kapitel 4.3.1.3 (S.98) zu entnehmen.

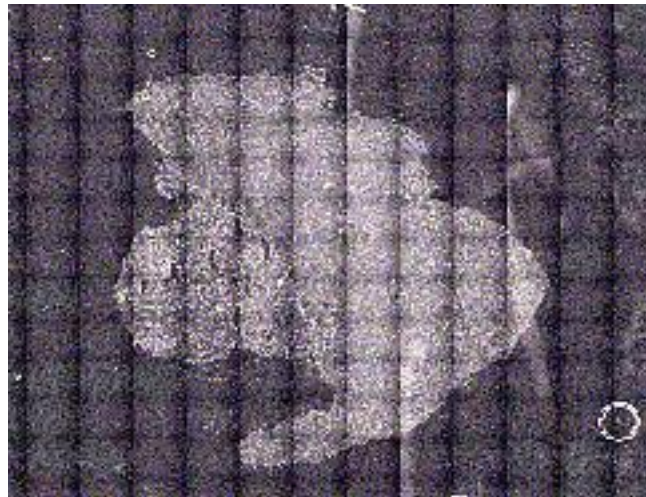


Abbildung 55: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Nach der Analyse des Konturplots liegt die maximale Zinkkonzentration, wie auch bei dem ID G3 Mammakarzinom mit DCIS G3 bei 16,8-18,0 ppm.

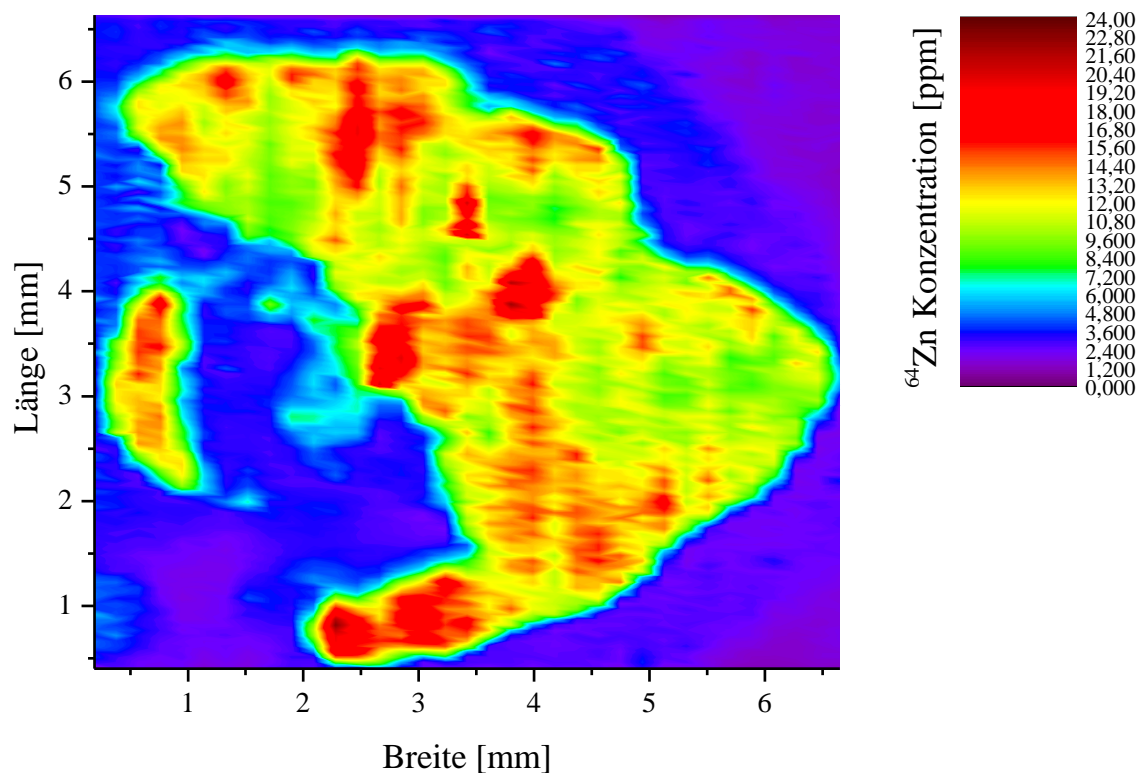


Abbildung 56: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

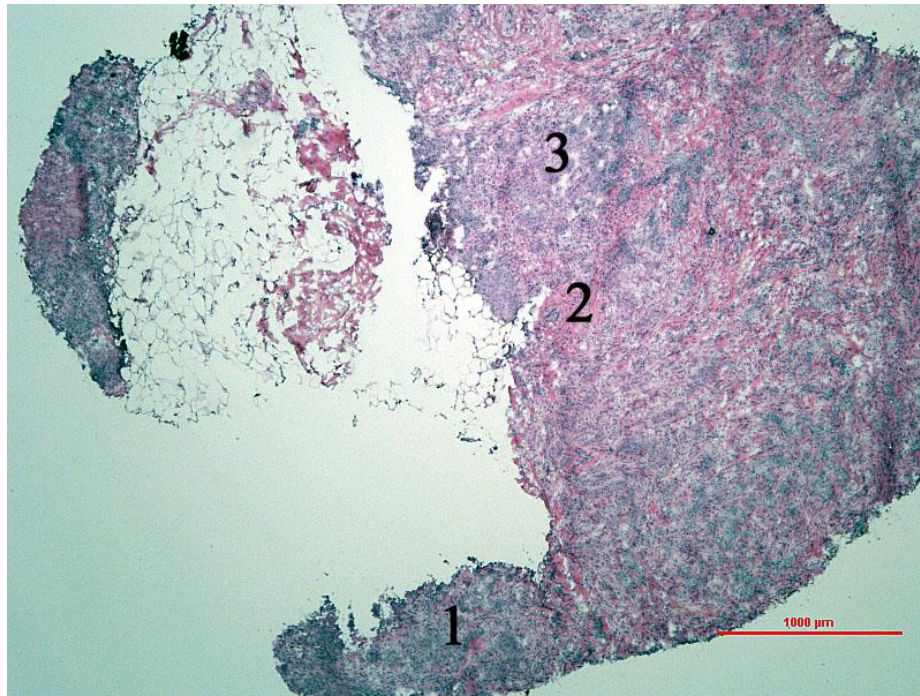


Abbildung 57: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Für die Stromabereiche werden ebenfalls gleiche Konzentrationsbereiche ermittelt.

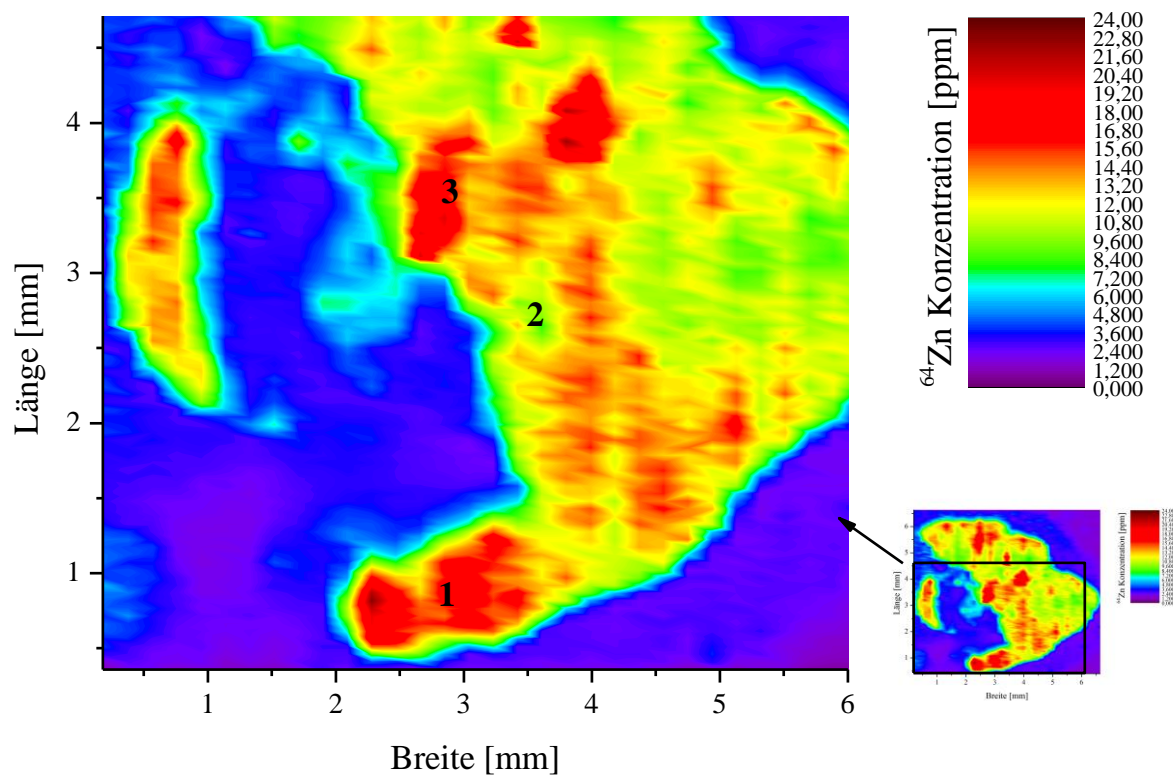


Abbildung 58: Ausschnitt eines Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Dieses Ergebnis zeigt, dass die mit den Krebszellen korrelierten Zinkkonzentrationen bei beiden Subtypen identische Konzentrationsbereiche aufweisen. Da beide Karzinome nach dem Grading als invasiv duktal G3 klassifiziert wurden, liegt der Verdacht nahe, dass der DCIS Anteil entweder keinen oder einen sehr geringen, nicht detektierbaren Einfluss auf die Zinkkonzentration hat.

4.3.2 Literaturvergleich der orts aufgelösten Zinkverteilung in Mammakarzinomen

Die Messergebnisse der LA-ICP-MS Analysen und daraus berechneten Konturplots zeigen, dass die Zinkkonzentrationsmaxima sehr gut mit den H&E gefärbten Krebszellen korreliert werden können. Des Weiteren konnte dargelegt werden, dass bei allen untersuchten Proben eine vollständig inhomogene Elementverteilung detektiert wurde, so dass sowohl Stroma- als auch Krebsgewebe mit dieser Analyse Methode eindeutig voneinander differenzierbar sind.

Durch die Kooperation mit Prof. Dr. Bankfalvi (Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen) wurden die Mammakarzinome hinsichtlich des Tumortyps und des histopathologischen Malignitätsgrades klassifiziert, so dass mit diesen Ergebnissen ein Messplan mit Bezug zu den Karzinomsubtypen erstellt werden konnte. Die Korrelation zwischen dem Element Zink und den unterschiedlichen Mammakarzinomsubtypen wurde bisher in keiner wissenschaftlichen publizierten Arbeit untersucht.

Der Vergleich mit den drei in der Literatur veröffentlichten Arbeiten bezüglich der Zinkverteilung in Brustkrebsgewebe [FARQUHARSON *et al.* 2008, 2009; DA SILVA *et al.* 2012] zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse. So konnte Farquharson [FARQUHARSON *et al.* 2008] mittels einer μ SRXRF Analyse ebenfalls eine signifikante Konzentrationszunahme des Elements Zink in

Krebszellbereichen detektieren. In Abbildung 59 sind diese Ergebnisse anhand des H&E gefärbten invasiv duktales Mammarkarzinoms, in dem die dunkel violetten Bereiche die detektierten Krebszellen zeigen, und des Zinkkonturplots illustriert.

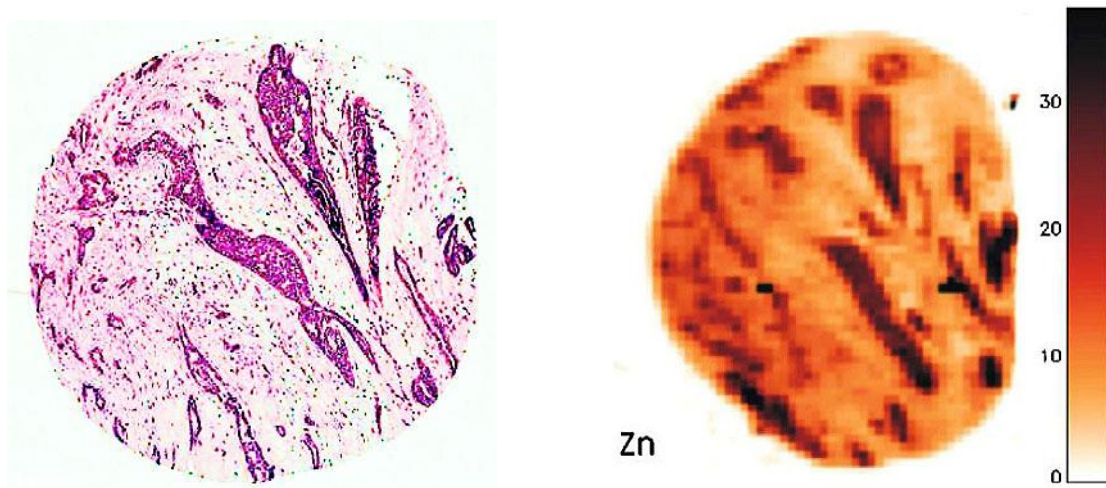


Abbildung 59: Bestimmung der orts aufgelöste Zinkverteilung in einem invasiv duktales Mammarkarzinom mittels μ SRXRF Analyse. H&E gefärbter Gewebeschnitt (links), Konturplot des Elements Zink (rechts, Skalierung in ppm) (Abbildung aus FARQUHARSON *et al.* 2008)

Des Weiteren ist anzumerken, dass die quantitative Zinkbestimmung ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis liefert, wobei in dieser Arbeit keine Differenzierung zum histopathologischen Malignitätsgrad durchgeführt wurde.

4.3.3 Zinkkonzentrationsvergleich der Karzinomsubtypen

Neben der erfolgreichen Korrelation der H&E gefärbten Krebszellen und der gegenüber dem Stroma erhöhten Zinkkonzentration wurde die Elementkonzentration in den definierten Bereichen berechnet.

Dazu wurden die Datenpunkte (Abbildung 60, rosa Rechtecke) der im ICP-MS detektierten Zink-Ionen in den markierten Bereichen extrahiert und anschließend mittels deskriptiver Statistik ausgewertet.

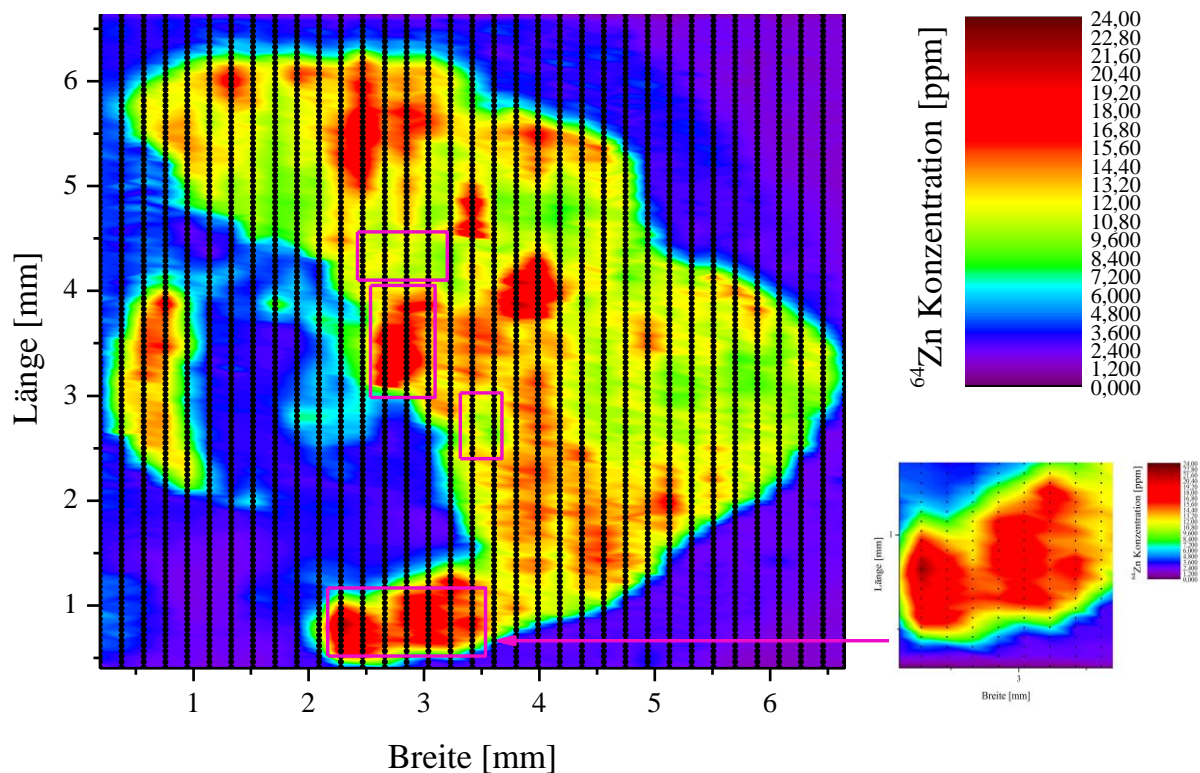


Abbildung 60: Zink-Konturplot eines invasiven duktalen Mammakarzinoms. Die Datenpunkte (schwarze Punkte) in den Rechtecken wurden für die Datenberechnung genutzt

Die schwarzen Punktreihen in Abbildung 60 stellen die gemessenen Datenpunkte dar. Diese wurden mittels der Geradengleichung der Kalibration in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet. Die statistische Auswertung ergab folgende Werte.

Tabelle 18: Konzentrationsvergleich der Mammakarzinomsubtypen

Subtyp	Krebszellen [ppm]		Stroma [ppm]		Konzentrationsverhältnis
ID G1	8,31	±0,92	4,17	±0,22	1,99
ID G1	8,52	±0,97	4,27	±0,33	2,00
IL G2	7,34	±0,51	4,80	±0,38	1,53
IL G2	6,89	±0,63	4,62	±0,47	1,49
ID G2	12,06	±1,11	6,17	±0,42	1,95
ID G2	12,39	±0,93	6,46	±0,49	1,92
ID G3, DCIS G3	17,59	±1,43	7,83	±1,08	2,25
ID G3	17,25	±1,45	8,12	±0,88	2,12
ID G3	17,89	±1,55	7,74	±1,01	2,31

Der Vergleich der korrelierten Zinkkonzentration zeigt, dass die Mittelwerte verschiedener Gewebeproben in einer Gradingklasse gleiche Messwerte innerhalb der Standardabweichungen aufweisen. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden pro Datenbereich 40 Messwerte verwendet. Die relativen Standardabweichungen sind mit 5,2-11,1 % in einem für die LA-ICP-MS Analyse guten Bereich.

Die Zinkkonzentrationen steigen von dem invasiv duktalem G1 Mammakarzinom mit 8,31 ppm und 8,52 ppm über das ID G2 Karzinom mit 12,06 ppm und 12,39 ppm bis zum ID G3 Karzinom mit 17,25 ppm und 17,89 ppm an. Diese Messwerte lassen die Schlussfolgerung zu, dass die glanduläre Differenzierung, die Kernpolymorphie und die Mitosezahl einen Einfluss auf die Zinkkonzentration besitzen. Da die Gradingklassifizierung eine Summierung der drei Faktoren ist, kann keine differenziertere Aussage getroffen werden.

Eine quantitative Korrelation einzelner Krebszellen und der Zinkkonzentration ist durch die Auflösung der LA-ICP-MS Messung limitiert.

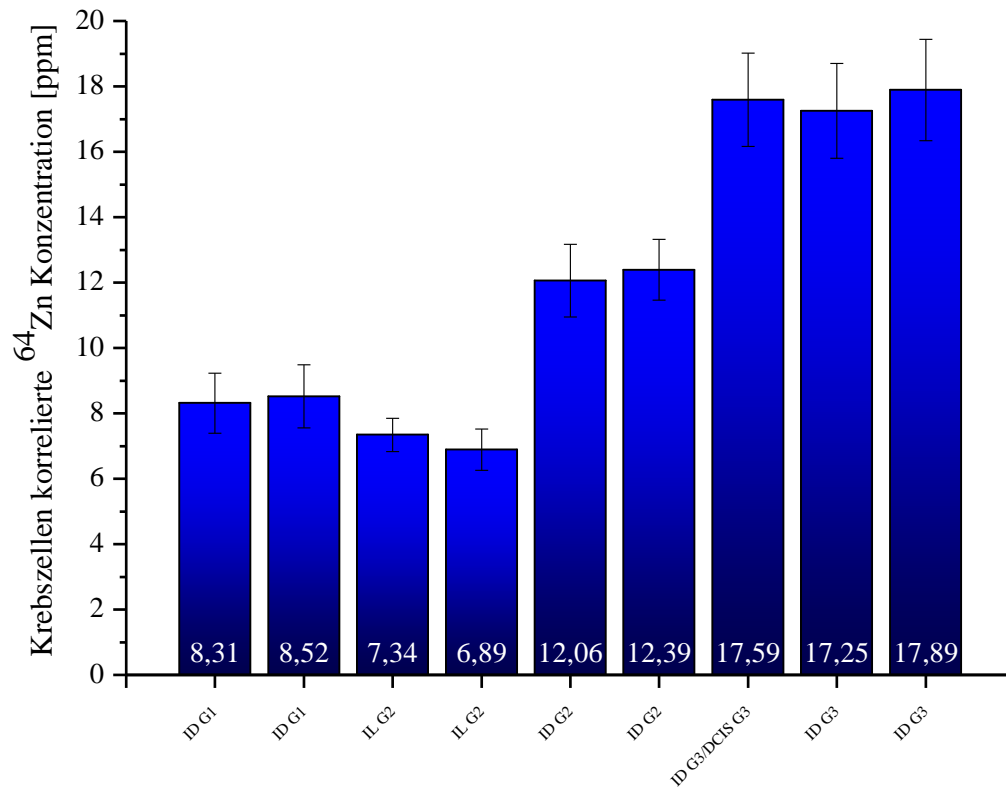


Abbildung 61: Säulendiagramm der Krebszellen-korrelierten Zinkkonzentrationen

In dem Säulendiagramm in Abbildung 61 ist zu sehen, dass die krebszellenkorrelierte Zinkkonzentration zwischen dem invasiv lobulären G2 und dem invasiv duktalem G2 Mammakarzinom divergieren. Erstere liegen mit einer Zinkkonzentration von 6,89 ppm und 7,34 ppm niedriger als die ID G2 Karzinome mit 12,06 ppm und 12,39 ppm.

Außerdem zeigt sich, dass der Anteil an duktal invasiven in-situ Komponenten in einem Vergleich zum invasiv duktalem G3 Mammakarzinom keinen Einfluss auf die Zinkkonzentration besitzt. Da die Tumore jedoch von ihrem Grading keinen Unterschied aufweisen, sondern lediglich ein Teil der Krebszellen einen in-situ-Anteil aufweist, ist eine annähernd gleiche Zinkkonzentration zu erwarten gewesen. Zugleich bestätigt dieses Ergebnis die Korrelation der Krebszellen und Zinkkonzentration, je höher das Grading desto höher ist die Zinkkonzentration.

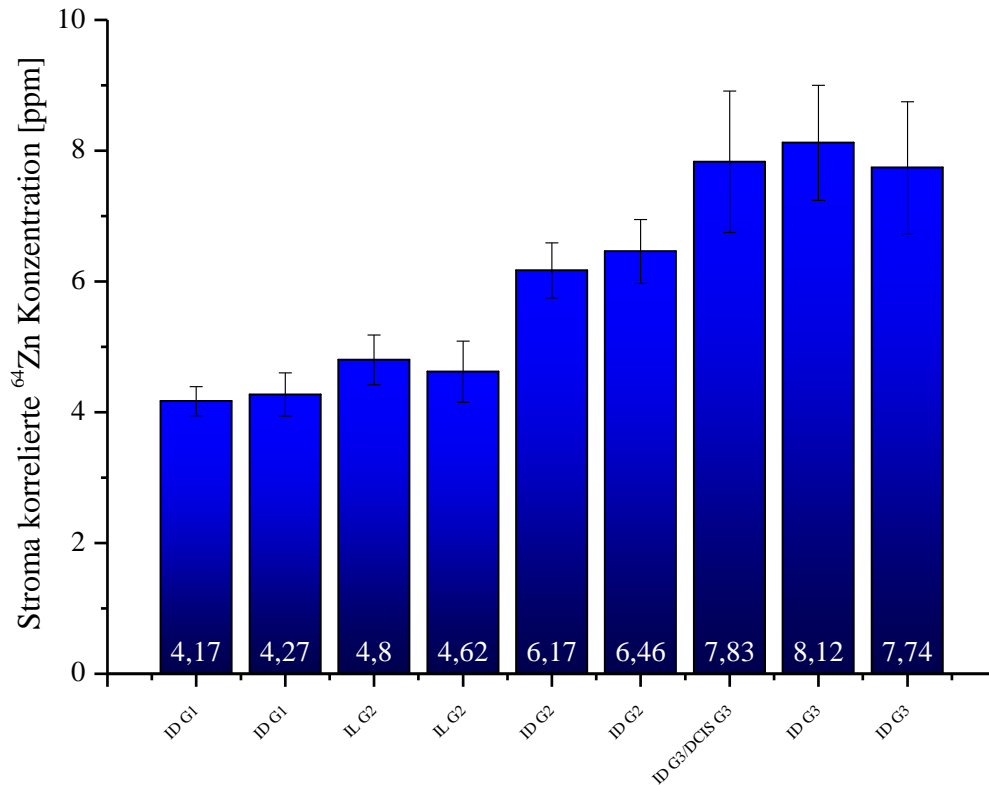


Abbildung 62: Säulendiagramm der Stroma-korrelierten Zinkkonzentrationen

Der Vergleich der mit dem Stroma korrelierten Zinkkonzentration zeigt, dass diese bei den invasiv duktafen G2 und G3 Mammakarzinomen, mit einem Wertebereich zwischen 6,17 ppm und 8,12 ppm, gegenüber dem G1 Subtyp signifikant erhöht sind. Die Zinkkonzentration des invasiv duktafen G1 Karzinoms weist Messwerte von 4,17 ppm und 4,27 ppm auf und liegt damit in demselben Konzentrationsbereich wie das invasiv lobuläre G2 Mammakarzinom mit 4,62 ppm und 4,80 ppm.

Sehr oft liegt beim invasiv-lobulären im Gegensatz zu den invasiv duktafen Mammakarzinomen keine desmoplastische Stromareaktion vor [BÖCKER UND DECKER 2008]. Hierbei handelt es sich um eine von einem Karzinom induzierte Bildung eines kollagenreichen Bindegewebes. Die Primärstruktur des Kollagens weist an jeder dritten Aminosäurestelle ein Glycin-Molekül auf, welches über eine koordinative Bindung ein Zink-Ion binden kann [HORNG *et al.* 2006]. Dies

wäre eine mögliche Begründung für die Konzentrationsdifferenz zwischen den ID G2 und ID G3 und den IL G2 Mammakarzinomen.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das berechnete Konzentrationsverhältnis, welches sich aus der Division von krebszell- und stromakorrelierter Zinkkonzentration ergibt. Die für die invasiv duktales Karzinome bestimmten Werte weisen mit Faktoren von 1,92-2,31 eine Verdopplung der Zinkkonzentration in den Krebszellen auf, während die invasiv lobulären Karzinome mit einem Faktor von 1,49 und 1,53 ein deutlich niedrigeres Verhältnis besitzen.

In Tabelle 19 sind die in der Fachliteratur publizierten Zinkkonzentrationen aufgelistet. Bei den Untersuchungen handelt es sich sowohl um Gesamtmetall- als auch um orts aufgelöste Analysen von nicht näher klassifizierten Mammakarzinomen. Die Differenzierung zwischen Krebs und Stroma erfolgte mittels histologischer H&E-Färbung.

Tabelle 19: Literaturvergleich der ermittelten Zinkkonzentrationen in Krebs- und Stromagewebe

Autor	Methode	Zn Krebs [ppm]	Zn Stroma [ppm]	Konzentrationsverhältnis
Rizk (1984)	EDXRF	68,1±26,9	25,6±12,1	2,7
Ng et al. (1997)	INAA	44,2±2,07	25,0±1,89	1,8
Geraki et al. (2002)	SRIXE	6,63±5,46	2,68±1,82	2,5
Geraki et al. (2004)	SRXRF	7,12±3,71	1,69±0,74	4,2
Magalhaes et al. (2006)	TXRF/ EDXRF	39±21/64±6	6±3/31±3	6,5/2,1
Naga Raju et al. (2006)	PIXE	126,23±12,72	56,19±5,79	2,2
Majewska et al. (2007)	EDXRF	6,43±3,44	5,43±3,93	1,2
Farquharson et al. (2008)	SRXRF	23,29±3,63	18,90±6,78	1,2
Silva et al. (2008)	SRXRF	12,9	3,8	3,4

Der Vergleich der fast ausschließlich mittels röntgenspektroskopischer Methoden bestimmter Zinkkonzentrationen zeigt eine große Varianz. Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 6,43 ppm und 126,23 ppm. Ein Faktor der zu der Divergenz der Messwerte beiträgt, ist dass die Untersuchungen an nicht näher klassifizierten Karzinomen durchgeführt wurden. Außerdem erfolgten einige Analysen an FFPE-Gewebeschnitten (formalin-fixed paraffin-embedded) während andere an gefroren Gewebe durchgeführt wurden. Die Wechselwirkung

zwischen der Probe und der für die Einbettung verwendeten organischen Lösungsmittel und Pufferlösungen führt zu einer Veränderung der Elementverteilung und –konzentrationen in der Probe.

Es ist jedoch anzumerken, dass auch bei Analysen mit einheitlicher Probenvorbereitung unterschiedliche Konzentrationen ermittelt worden sind. So detektierte Geraki [GERAKI *et al.* 2004] an gefrorenen Proben eine Zinkkonzentration in neoplastischem Gewebe von 7,12 ppm während die Quantifizierung von Magalhaes [MAGALHAES *et al.* 2006] einen Wert von 39 ppm ergab.

Abschließend kann festgehalten werden, dass dieser bisher neue Untersuchungsansatz zu Ergebnissen geführt hat, welche mit einem Konzentrationsbereich zwischen 6,89 ppm und 17,89 ppm in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur publizierten Messergebnissen liegt. Dies ist in Bezug auf die unterschiedlichen Analysensysteme ein sehr gutes Ergebnis.

Des Weiteren ist anzumerken, dass ein großer Teil der berechneten Konzentrationsverhältnisse mit Werten zwischen 1,2-3,4 in einem identischen Bereich mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten angesiedelt ist (Tabelle 18, S.116).

4.4 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS hinsichtlich der orts aufgelösten Elementverteilung in Mammakarzinomen

Eine neben der LA-ICP-MS häufig verwendete Methode der orts aufgelösten Elementdetektion in Gewebeschnitten ist die Röntgenfluoreszenzanalyse. In fast allen bisher publizierten Untersuchungen wurde die Synchrotron basierte SRXRF Technik, aufgrund ihrer Multielementfähigkeit und guten Nachweisstärke eingesetzt (Tabelle 19, S.120).

Da der Einsatz einer SRXRF durch eine geringe Anzahl an Messanlagen limitiert ist, wurde als sogenannter „proof of principle“ ein μ -RFA bench-top-Gerät eingesetzt, um die Parallelschnitte der LA-ICP-MS Untersuchungen zu analysieren. Der Fokus lag hierbei auf der einen Seite auf der Machbarkeit hinsichtlich Messzeit und Sensitivität und auf der anderen Seite auf der Bestätigung der ermittelten Elementverteilung mit einer komplementären Analystechnik.

Neben der Korrelation der orts aufgelösten Zinkkonzentration mit den H&E gefärbten Krebszellen, wurde die Multielementfähigkeit des LA-ICP-MS genutzt um die Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel und Eisen und Kupfer zu detektieren. Der Vergleich der beiden Methoden hinsichtlich der aufgelisteten Elemente erfolgt qualitativ an den erstellten Konturplots.

Die Auswahl dieser Elemente resultiert aus der großen physiologischen Bedeutung für den humanen Organismus. Die Elemente Phosphor und Schwefel sind als Heteroelemente häufig in Peptiden oder Proteinen vertreten, während der Kohlenstoff ein Hauptbestandteil des Gewebes ist. Die Elemente Eisen und Kupfer fungieren in vielen Proteinen und Enzymen als aktives Zentrum und stellen mit dem Zink die drei häufigsten Elemente im humanen Plasma dar [SZPUNAR 2005, LOH 2010].

4.4.1 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

Nachdem die Korrelation zwischen den H&E gefärbten Krebszellen und der signifikant erhöhten Zinkkonzentration gezeigt werden konnte, werden im Folgenden die Analysenergebnisse der LA-ICP-MS und der μ -RFA von zwei Parallelschnitten verglichen. Die Messparameter sind Kapitel 3.4 und 3.6 zu entnehmen.

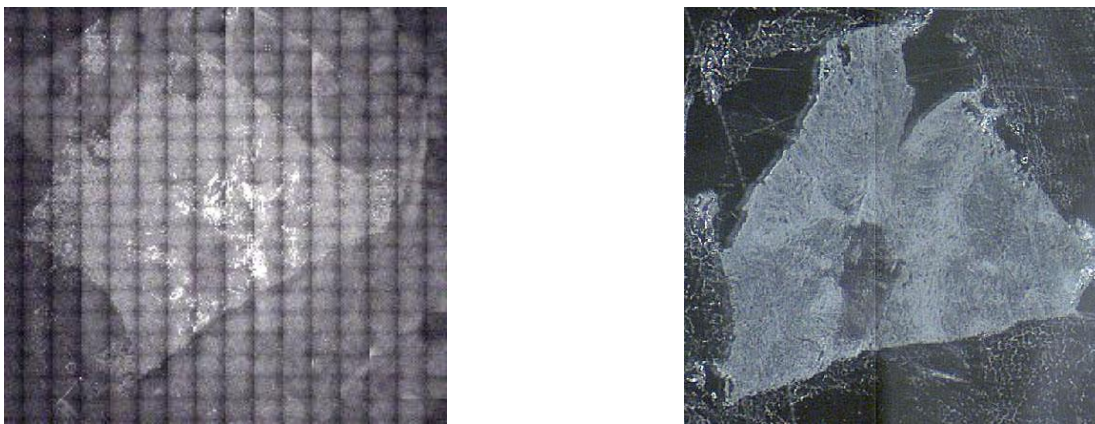


Abbildung 63: Kameraaufnahmen zweier ID G1 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

In Abbildung 63 sind die Kameraaufnahmen der beiden Mammakarzinomschnitte zu sehen. Der Konturunterschied der beiden Proben ist auf die Anfertigung des Gewebeschnittes zurückzuführen. Im linken oberen Bereich der Probe befand sich Einbettmedium, welches aufgrund der einwirkenden Scherkräfte abgetrennt worden ist.

Dies lässt sich durch die LA-ICP-MS Messergebnisse in Abbildung 64 und Abbildung 65 bestätigen, da in diesen Bereichen nur sehr geringe Intensitäten von Schwefel und Phosphor detektiert wurden. Eine weiterer Begründung ist die gegenüber dem Gewebeschnitt deutlich erhöhte Kohlenstoffintensität (Abbildung 88, S.186) in Bereich 2 dieser Abbildung. Das Phänomen, dass auf der einen Seite die Kohlenstoffintensität stark erhöht ist und auf der anderen Seite alle anderen Elemente in der gleichen Gewebesektion stark erniedrigte

Intensitäten aufweisen, wurde bei sehr vielen Messungen beobachtet. Da es sich bei allen Analysen ausschließlich um Randbereiche der Gewebeproben handelte, war die Problematik einer Beeinflussung der Messergebnisse nicht gegeben.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Zinkkonzentration (Abbildung 34, S.92) in diesem Bereich mit 0,5 ppm eine identische Konzentration wie das umgebenden Einbettmedium aufweist.

Außerdem lassen sich die beiden Kameraaufnahmen über den Bereich eins (Abbildung 64) in dem sehr niedrige Schwefel und Phosphorintensitäten (Abbildung 65) detektiert werden, zueinander ausrichten.

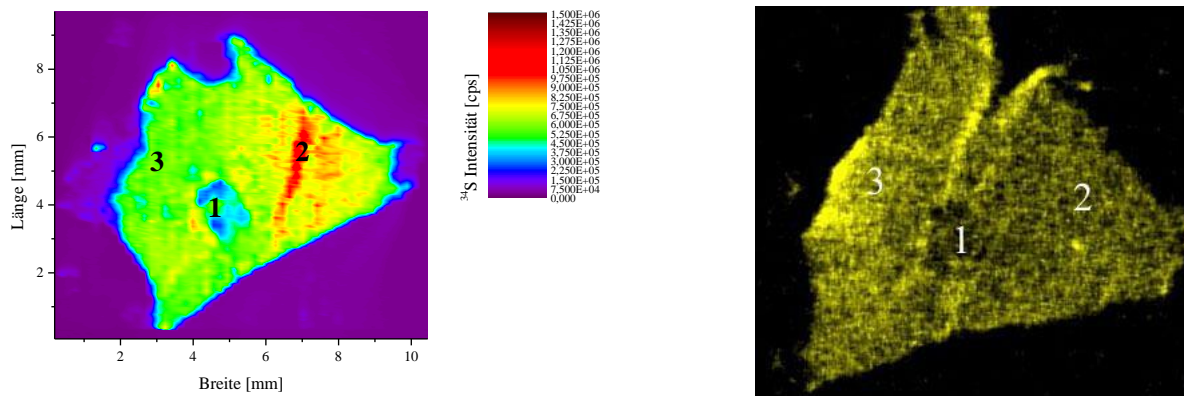


Abbildung 64: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktalen G1 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Die Intensitätsunterschiede in den Bereichen zwei und drei im LA-ICP-MS Konturplot können mit den Messergebnissen der μ -RFA Analyse nicht bestätigt werden. Der μ -RFA Konturplot zeigt bis auf Bereich drei und oberhalb von Bereich eins eine homogene Schwefelintensitätsverteilung, wodurch illustriert wird, dass diese Methode auf dem Element Schwefel keine ausreichende Nachweisstärke besitzt. Die intensiver gefärbten Bereiche resultieren aus dem Herstellungsprozess. Bei nicht optimal eingestelltem Scherwinkel oder einer falschen Klingentemperatur kann sich das Gewebe durch die einwirkenden Scherkräfte der Hobeltechnik verdichten, so dass die Schichtdicke nicht mit der vorgegebenen übereinstimmt.

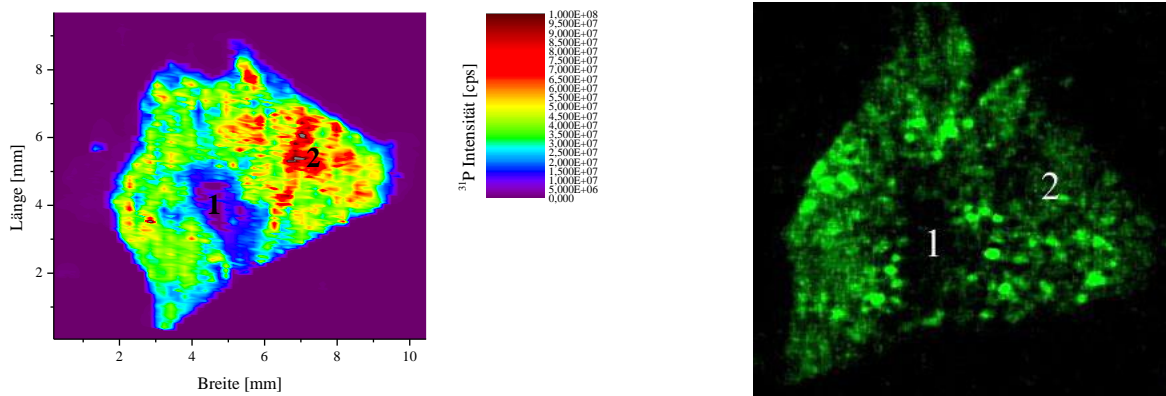


Abbildung 65: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Bei dem Vergleich der Phosphor-Konturplots in Abbildung 65 ist im Bereich eins mit beiden Messmethoden im Verhältnis zum umliegenden Gewebe eine niedrigere Intensität detektiert worden. Die Messergebnisse der LA-ICP-MS und der μ -RFA zeigen in diesem Bereich der Probe eine sehr gute Übereinstimmung. Des Weiteren ist in beiden Konturplots eine inhomogene Elementverteilung zu erkennen, jedoch ist anzumerken, dass die hohen Phosphorintensitäten im Bereich 2 der LA-ICP-MS Messung mit der μ -RFA nicht bestimmt werden konnten. Eine mögliche Begründung ist eine nicht optimale Probenvorbereitung, bei der Bereiche der Probe durch die Scherkräfte gestreckt wurden. Diese Vermutung kann durch die detektierte P-Intensitätszunahme unterhalb des Gebietes zwei im μ -RFA Konturplot untermauert werden.

Die Analyse der Elemente Eisen, Kupfer und Zink war mit der μ -RFA aufgrund einer nicht ausreichenden Sensitivität der Methode nicht möglich.

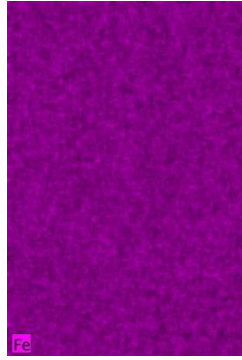


Abbildung 66: Eisen-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinom

In Abbildung 66 ist exemplarisch der Eisen-Konturplot der μ -RFA Messung zu sehen der zeigt, dass das detektierte Signal nicht größer als das Hintergrundrauschen ist.

Die LA-ICP-MS Konturplots der Elemente Schwefel (Abbildung 64) und Phosphor (Abbildung 65) sowie des Zinks (Abbildung 34, S.92) weisen hinsichtlich ihrer Intensitätsmaxima eine sehr gute Korrelation auf. Aufgrund der Tatsache, dass im Zytoplasma einer eukaryotischen Zelle eine hohe Konzentration an Proteinen, Enzymen und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) vorhanden ist, kann die Intensitätserhöhung der Heteroelemente eine Bestätigung für eine Zellakkumulation gegenüber dem kollagenreichen Bindegewebe sein.

4.4.2 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

Im Folgenden werden die Analysenergebnisse der μ -RFA und der LA-ICP-MS in Bezug auf ein invasiv duktales G2 Mammakarzinom verglichen.

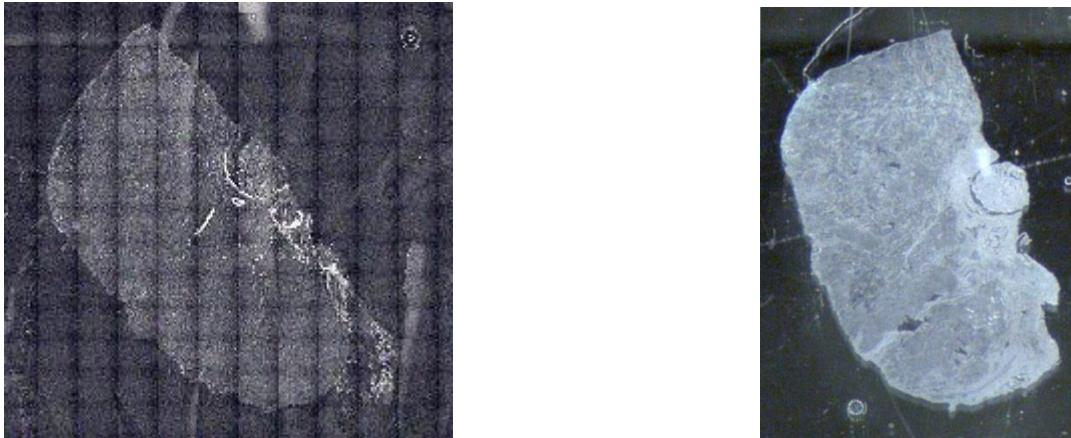


Abbildung 67: Kameraaufnahmen zweier ID G2 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Die beiden Kameraaufnahmen der Gewebeschnitte zeigen eine sehr gute Kongruenz. Beim Vergleich der beiden Schwefelkonturplots ist zu sehen, dass die Konturen der Messungen übereinstimmen, dass jedoch das Ergebnis der Röntgenfluoreszenzanalyse aufgrund der Limitierung hinsichtlich der Nachweisstärke eine homogene Elementverteilung zeigt. Auf der anderen Seite illustriert der LA-ICP-MS Konturplot eine inhomogene Elementverteilung mit einem Intensitätsmaximum im Bereich eins.

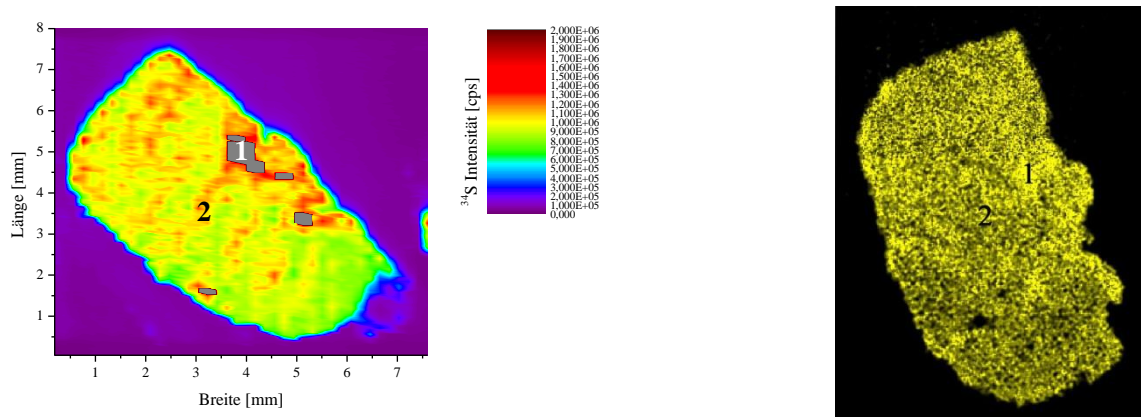


Abbildung 68: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der µ-RFA Analyse

In diesem Bereich befindet sich nach der Korrelation mit der Kameraaufnahme (Abbildung 67) und dem H&E gefärbten Karzinomschnitt (Abbildung 39, S. 97) das Einbettmedium zwischen dem Blutgefäß und dem angrenzenden Gewebe. Im Bereich 2 ist ebenfalls eine Intensitätszunahme zu erkennen, welche mit den maximalen Intensitäten der Bereiche eins, zwei und drei des Zink- (Abbildung 64, S.124) und Phosphorkonturplots (Abbildung 69) korreliert. Neben diesen Ergebnissen wurde jedoch im gesamten oberen Probenbereich eine erhöhte Schwefelintensität ermittelt, welche weder mit einem der beiden Elemente noch mit den Krebszellen korreliert.

Der Vergleich der beiden P-Konturplots zeigt eine deckungsgleiche Grundfläche sowie konforme Intensitätsmaxima der Bereiche eins bis vier. Somit kann auch bei dem invasiv duktales G2 Mammakarzinom eine Korrelation zwischen den Elementen Phosphor und Zink als auch der H&E gefärbten Krebszellen gezeigt werden. Bei der abgegrenzten Fläche vier handelt es sich wie schon erwähnt um ein Blutgefäß.

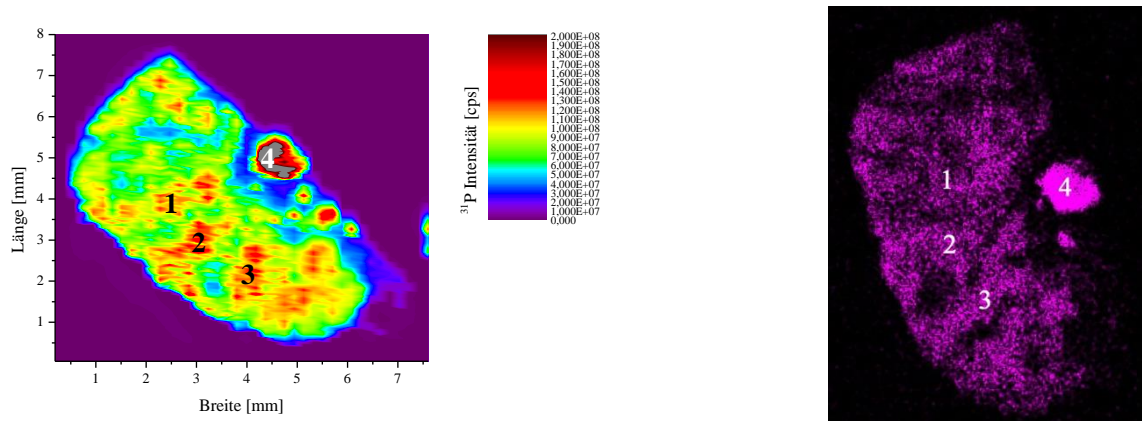


Abbildung 69: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass, neben der im ID G2 gegenüber dem ID G1 Karzinom höheren Zinkintensität, ebenfalls eine höhere Phosphorintensität detektiert wird. Die maximalen Intensitäten in den gekennzeichneten Bereichen betragen im ersten Fall 2×10^8 cps, während beim G1 Mammakarzinom 1×10^8 cps bestimmt wurden.

4.4.3 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

In Bezug auf das invasiv duktales Mammakarzinom wird abschließend ein G3 Gewebeschnitt hinsichtlich weiterer Elementkorrelationen untersucht.

Die Konturen der beiden Gewebeschnitte sind deckungsgleich, wobei zu erkennen ist, dass die Dimensionen nicht identisch sind.

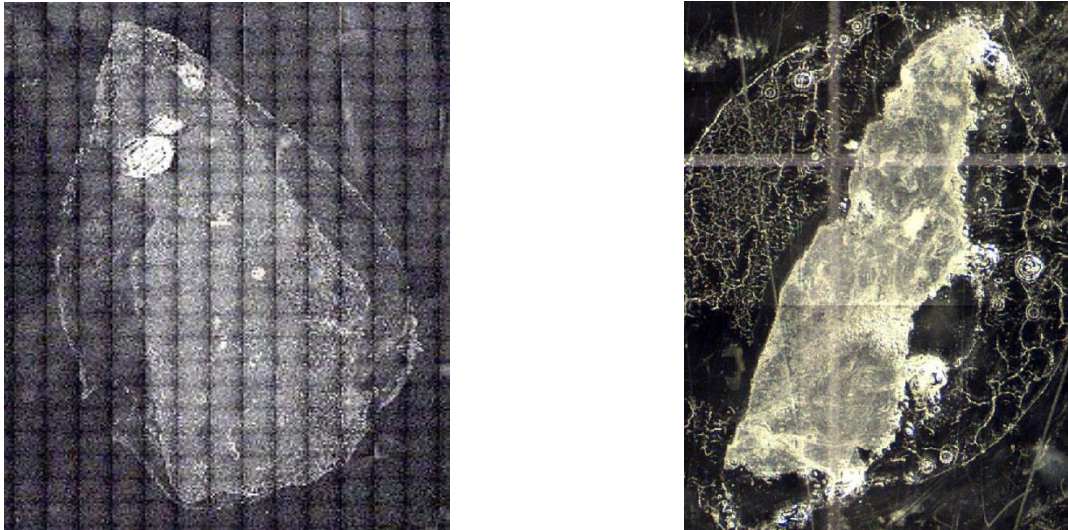


Abbildung 70: Kameraaufnahmen zweier ID G3 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Der Schwefelkonturplot der Röntgenfluoreszenzanalyse zeigt eine inhomogene Intensitätsverteilung. In den Bereichen eins und zwei ist sowohl bei dem LA-ICP-MS als auch bei der μ -RFA eine Intensitätserhöhung zu erkennen, jedoch ist diese bei letzterer auf wesentlich kleineren Bereichen lokalisiert als bei der massenspektrometrischen Untersuchung.

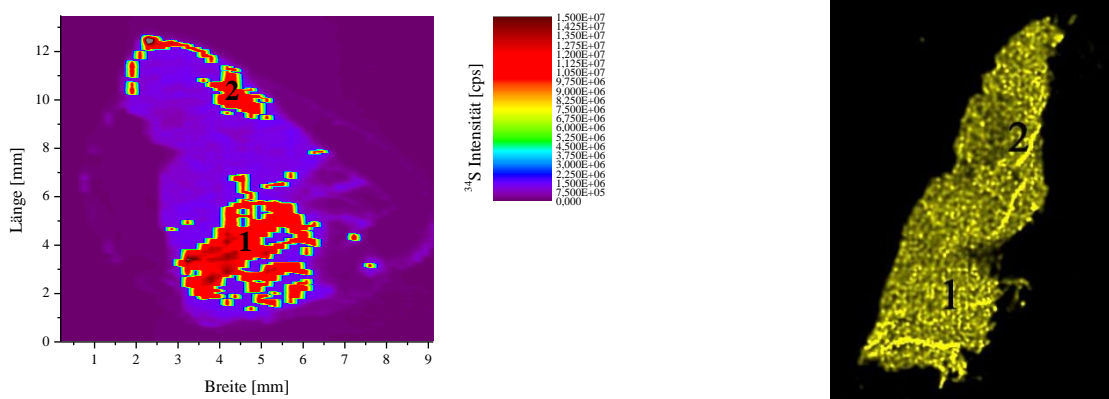


Abbildung 71: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Die Korrelationsanalyse des Elements Phosphor zeigt in den Bereichen eins bis drei eine gute Übereinstimmung. Während die Intensitätsmaxima den Bereichen

eins und drei zugeordnet werden können, sind für den angrenzenden Bereich zwei deutlich niedrigere Messwerte zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse sind kongruent zu den detektierten Zinkkonzentration und den H&E gefärbten Krebszellen. So kann gezeigt werden, dass sowohl mittels dem LA-ICP-MS als auch mit der μ -RFA in dem Stroma des Brustgewebes (Bereich zwei) eine geringere Phosphorintensität bestimmt werden konnte.

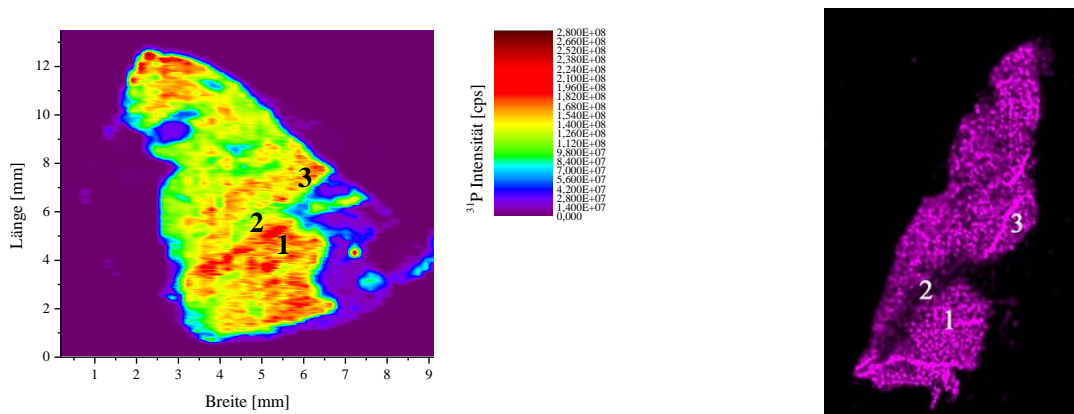


Abbildung 72: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass sowohl die maximalen Schwefel- als auch die Phosphorintensitäten bei dem ID G3 Karzinom mit $1,5 \times 10^7$ cps und $2,8 \times 10^8$ cps höhere Werte als bei den ID G2 und ID G1 Mammakarzinomen aufweisen. Somit zeigt sich, dass die in Kapitel 4.3.2 beschriebene Zinkkonzentrationszunahme mit steigendem Grading, ebenfalls für die Elemente Schwefel und Phosphor gültig ist.

4.4.4 Methodenvergleich zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS bei der Untersuchung des invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

Der Vergleich zwischen den μ -RFA und LA-ICP-MS Messergebnissen wurde auch mit einem invasiv lobulären G2 Mammakarzinom durchgeführt. Die Konturen der beiden parallelen Gewebeschnitte ist, wie in Abbildung 73 zu sehen, identisch.

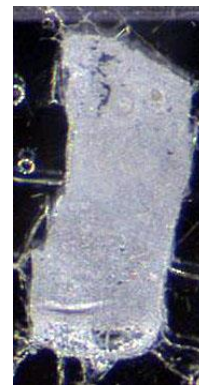
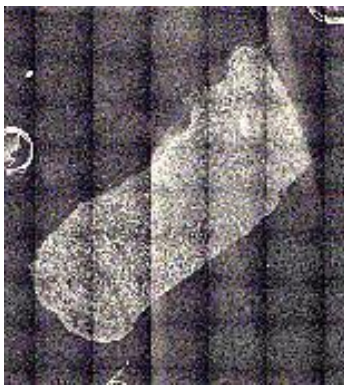


Abbildung 73: Kameraaufnahmen zweier IL G2 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Der Schwefel-Konturplot der Röntgenfluoreszenzanalyse zeigt, bis auf das Intensitätsmaximum oberhalb von Bereich zwei, eine homogene Elementverteilung, während im Konturplot des LA-ICP-MS ein Intensitätsunterschied im Gewebeschnitt zu sehen ist.

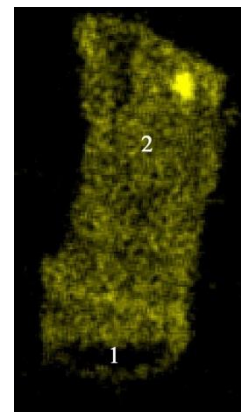
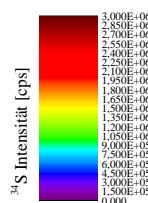
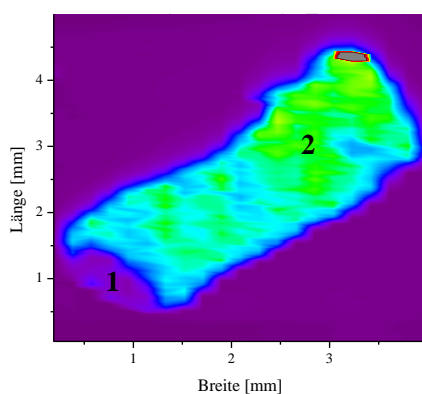


Abbildung 74: Schwefel-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Im Bereich zwei der Probe wurde eine größere Intensität gemessen als im unteren Teil. Konformität herrscht bei der niedrigen Schwefelintensität im Bereich 1. Dies ist auf das Einbettmedium zurückzuführen und kann durch das Kohlenstoffmaximum (Abbildung 98, S. 194) bestätigt werden. Eine identische Beobachtung wurde bereits beim ID G3 Mammakarzinom beobachtet (Abbildung 94, S. 191).

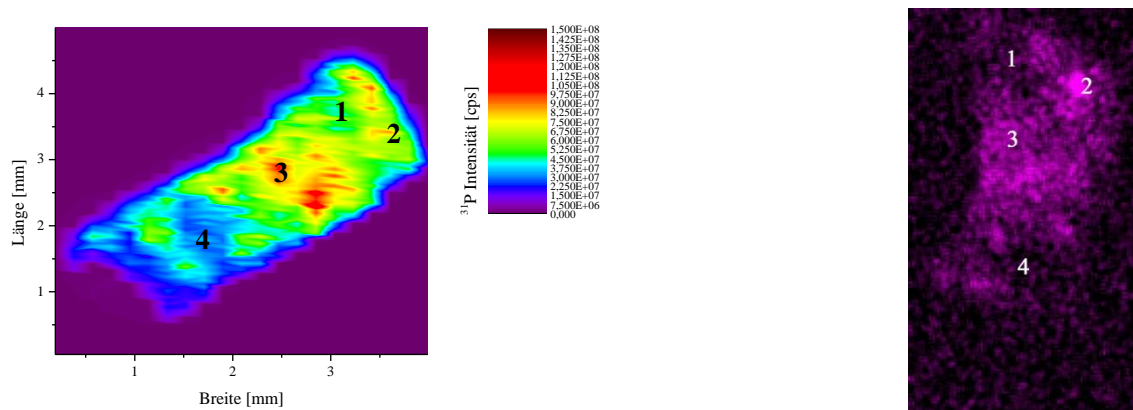


Abbildung 75: Phosphor-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse

Der Vergleich des Elements Phosphor zeigt eine sehr gute Intensitätsübereinstimmung. Die niedrigeren Intensitätsbereiche eins und vier sind in beiden Konturplots zu erkennen, sowie die Bereiche zwei und drei, in denen die maximalen Phosphorintensitäten detektiert wurden.

4.4.5 Literaturvergleich der orts aufgelösten Röntgenfluoreszenzanalyse von Mammakarzinomen

Der Methodenvergleich zwischen der LA-ICP-MS und der μ -RFA zeigt, dass die röntgenspektroskopische Methode hinsichtlich der Elemente Phosphor und Schwefel für eine Bestätigung der massenspektrometrisch bestimmten Elementverteilung herangezogen werden kann. Für die Detektion der Elemente Eisen, Kupfer und Zink ist dies aufgrund unzureichender Nachweisempfindlichkeit nicht möglich. Es ist jedoch anzumerken, dass durch

die Erhöhung der Gewebeschichtdicken eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit gegeben wäre.

Die Arbeit von da Silva [DA SILVA *et al.* 2012] zeigt die Korrelation der Elemente Eisen und Zink mit den H&E gefärbten Krebszellen eines invasiv duktalen Mammakarzinoms. In den hellen lilafarbenen Bereichen in der Bildmitte, in denen das Stroma lokalisiert ist, sind sowohl im Konturplot des Eisens als auch des Zinks Bereiche mit sehr niedrigen Intensitäten zu erkennen. Die dunkel lila eingefärbten Bereiche entsprechen den Krebszellen. Hier ist eine deutliche Intensitätserhöhung detektiert worden. Für das Element Kupfer konnte bei dieser Untersuchung keine Korrelation aufgezeigt werden.

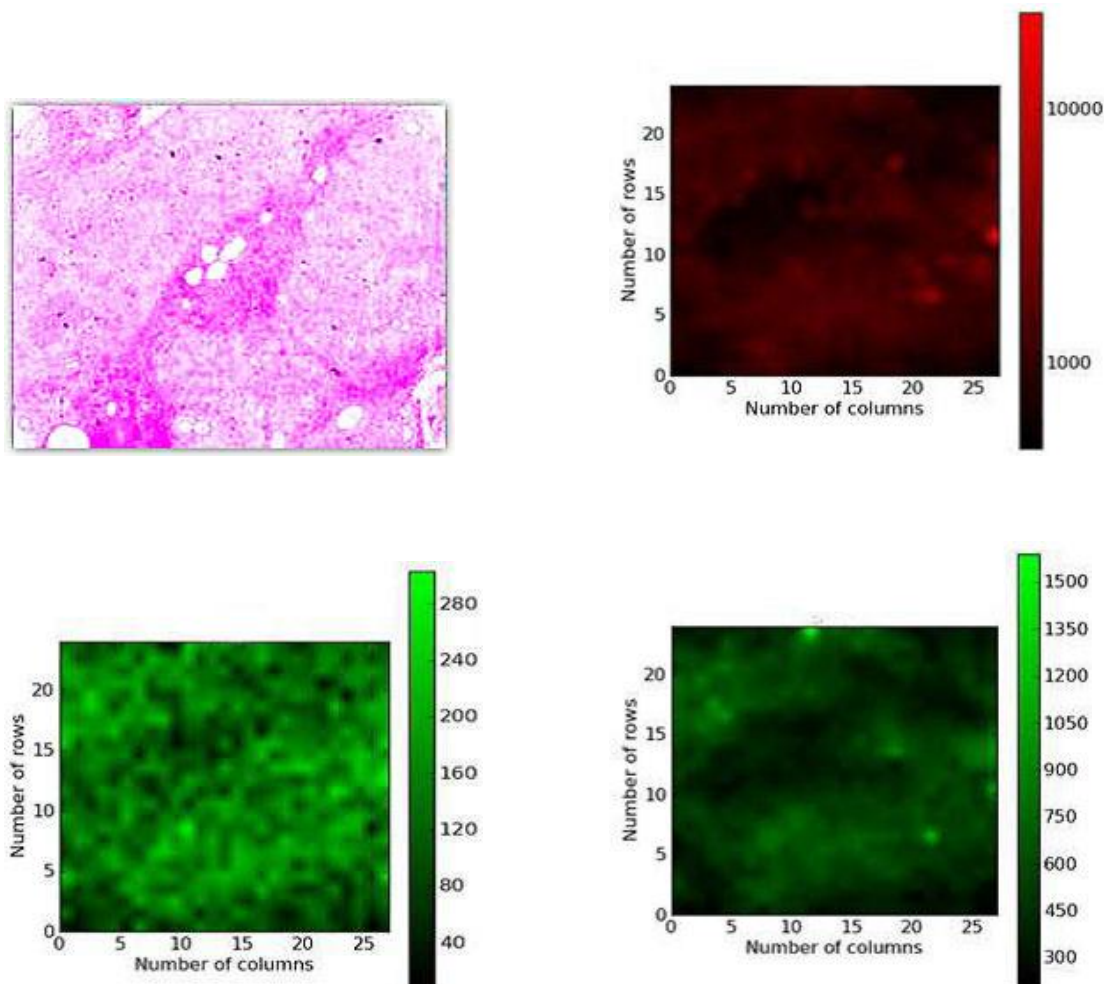


Abbildung 76: SRXRF Analyse eines invasiv duktalen Mammakarzinoms. H&E gefärbter Gewebeschnitt (links oben); Eisenkonturplot (rechts oben); Kupferkonturplot (links unten); Zinkkonturplot (rechts unten) (Abbildungen aus DA SILVA *et al.* 2012)

Diese Analyse wurde mit einem Synchrotron-Röntgenfluoreszenzspektroskop durchgeführt, welches im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten μ -RFA eine um 10^3 -fach niedrigere Nachweisgrenzen besitzt. Außerdem wurden eine Gewebeschichtdicke von 60 μm und eine Messzeit von 10 s pro Messpunkt gewählt. Das Resümee dieses Vergleiches ist, dass auch durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung beim Element Kupfer keine Differenzierung zwischen den krebszellen- und stromakorrelierten Bereichen zu erkennen ist.

Außerdem zeigt dieser Vergleich, dass die röntgenspektroskopische Analysentechnik ebenfalls eine Intensitätserhöhung des Elements Zink in den Krebszellen detektieren konnte und somit die mittels LA-ICP-MS bestimmten Messergebnisse bestätigt.

4.5 Untersuchung der Karzinomsubtypen hinsichtlich der Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer

4.5.1 Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink

Neben der qualitativen visuellen Korrelation der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink zwischen der LA-ICP-MS, μ -RFA und der histopathologischen Untersuchung, wird eine Streudiagrammanalyse durchgeführt.

Hierbei stellt man die Verteilung der Messwerte zweier Elemente dar, indem diese in einem kartesischen Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen werden. Anschließend kann mittels linearer Regression durch die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 ein quantitativer Zusammenhang zwischen den untersuchten Elementen hergestellt werden. Das Bestimmtheitsmaß gibt den Anteil an der Gesamtvarianz an, der durch das Regressionsmodell beschrieben wird.

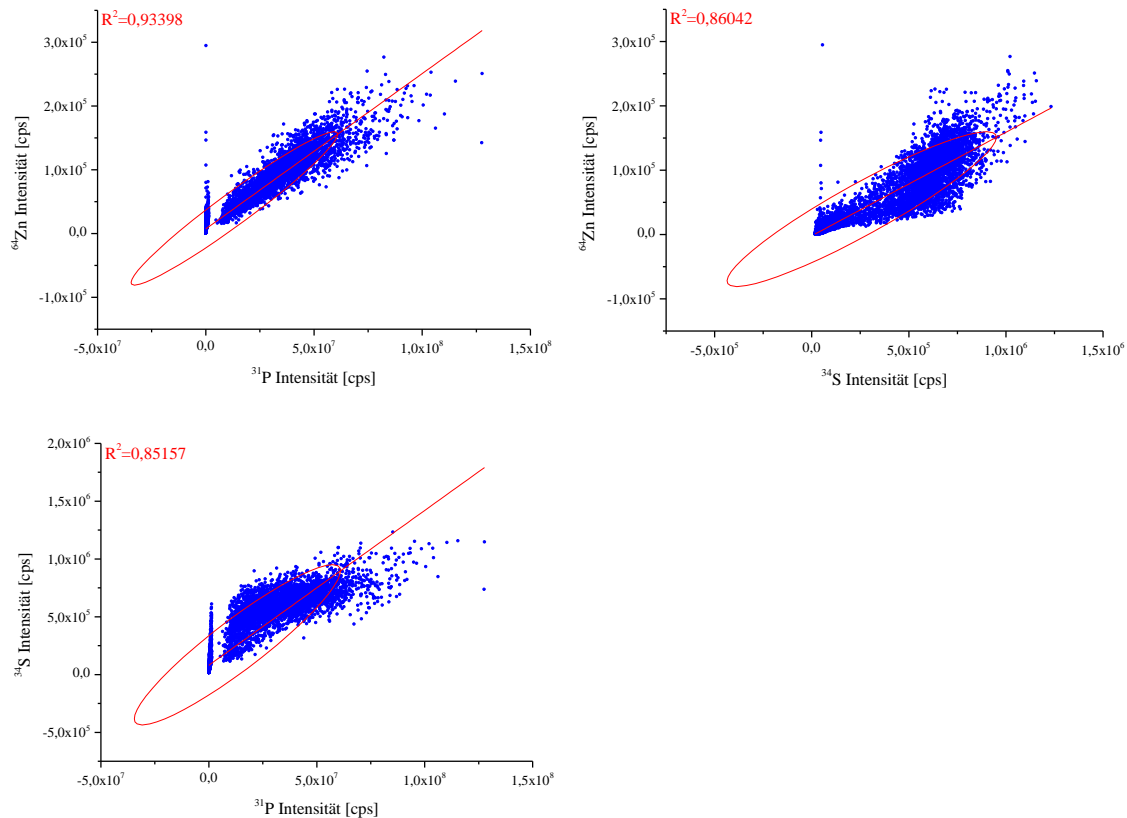


Abbildung 77: Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

In Abbildung 77 sind drei Streudiagramme abgebildet, in denen jeweils die Intensität der Elemente Zink gegen Phosphor, Zink gegen Schwefel und Phosphor gegen Schwefel aufgetragen sind. Ein großer Teil der Messwerte liegt in der eingezeichneten Ellipse, welche das 95 % ige Konfidenzintervall der Berechnung visualisiert. Des Weiteren zeigt das aus der linearen Regression hervorgehende Bestimmtheitsmaß R^2 in allen drei Analysen, mit Werten zwischen 0,85 und 0,93, einen hohen Grad des Zusammenhangs der Elementsignale an. Die Wahrscheinlichkeit des linearen Zusammenhangs ist durch die geringe Differenz zu $R^2=1$ sehr groß.

Die in Tabelle 20 aufgelisteten Bestimmtheitsmaße zeigen, dass die Korrelation zwischen den Elementen Phosphor, Schwefel und Zink, unabhängig von dem Karzinomsubtyp ist. Alle weiteren Streudiagramme sind Kapitel 10.3 (S.195) abgebildet.

Tabelle 20: Bestimmtheitsmaß R^2 der Streudiagrammanalysen zwischen den Elementen Phosphor, Schwefel und Zink

	R^2 (Zn gegen P)	R^2 (Zn gegen S)	R^2 (P gegen S)
ID G1	0,93	0,86	0,85
IL G2	0,90	0,95	0,94
ID G2	0,84	0,94	0,93
ID G3	0,82	0,94	0,87

Die ermittelten Werte bestätigen die qualitative Konturplotkorrelation der Elemente. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass in den Bereichen in denen die erhöhte Zinkkonzentrationen mit den H&E gefärbten Krebszellen korreliert werden konnte, ebenfalls eine Intensitätszunahme der Proteinheteroelemente Phosphor und Schwefel vorhanden ist.

Eine visuelle Illustration dieser Korrelation ist in Abbildung 78 zu sehen. Die Konturplots zeigen die sehr gute Übereinstimmung der lokalen Elementverteilung eines invasiv duktales Mammakarzinoms. Der Beweis, dass es sich bei den Konzentrationsmaxima um Krebszellbereiche handelt, wurde bereits in Kapitel 4.3.1.2 (S.95) erbracht.

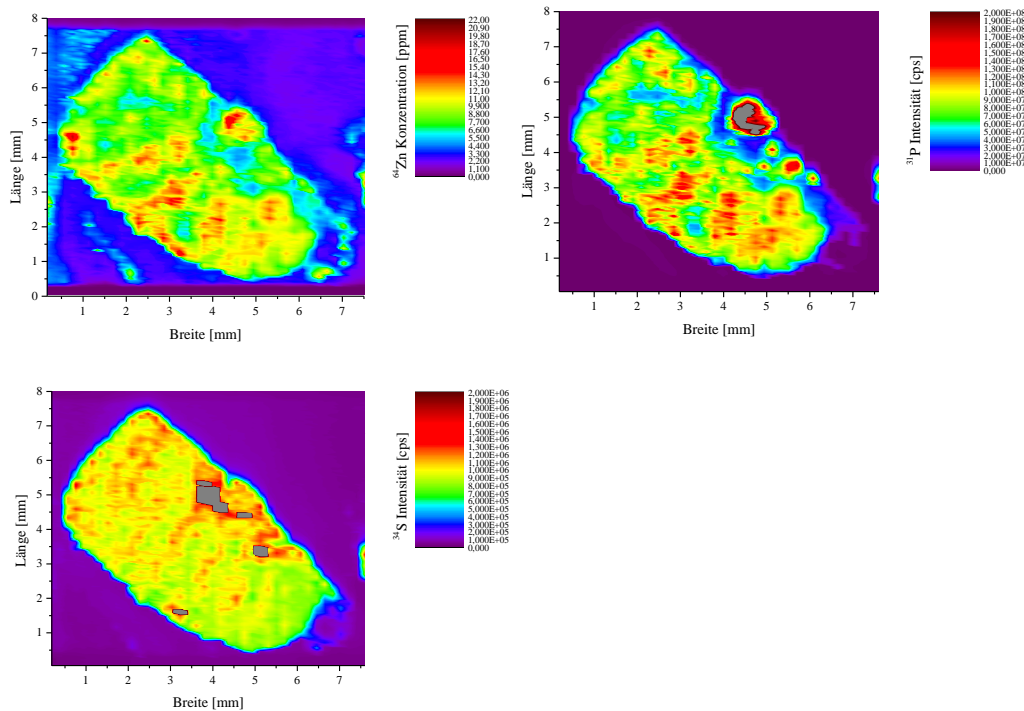


Abbildung 78: Konturplots der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink eines invasiv duktales Mammakarzinoms

4.5.2 Intensitätsverhältnisse der Elemente Kohlenstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen und Kupfer zwischen Krebsgewebe und Stroma

Bei der orts aufgelösten Elementanalyse mit dem multielementfähigen LA-ICP-MS wurde neben dem Element Zink auch Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer detektiert. Diese Elemente sind in vielen Proteinen und Enzymen vorhanden und an vielen physiologisch relevanten Reaktionen beteiligt. Der Vergleich der Elemente erfolgt sowohl intra- und interspezifisch bezüglich der Mammakarzinomsubtypen.

Für diesen Vergleich werden aus den Datensätzen die krebszellen- und stromazellenkorrelierten Messdatenbereiche extrahiert. Anschließend werden die Elementsignale der unterschiedlichen Bereiche mittels deskriptiver Statistik ausgewertet.

Eine Visualisierung der Datenextraktion ist in Abbildung 60 (S.115) dargestellt. Aus den errechneten Mittelwerten wurde anschließend ein Verhältnis gebildet,

indem die krebszellkorrelierten durch die stromakorrelierten Intensitäten dividiert wurden.

Der qualitative Vergleich erfolgt anhand der detektierten Intensitäten.

Tabelle 21: Berechnete Intensitätsverhältnisse zwischen Krebszellgewebe und Stroma für die Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer

	ID G1	ID G2	ID G3	IL G2
¹³ C	1,51±0,13	1,92±0,50	1,40±0,07	1,27±0,04
³¹ P	2,13±0,49	1,21±0,46	2,00±0,17	1,22±0,11
³⁴ S	1,56±0,13	12,72±2,51	12,64±0,80	1,52±0,06
⁵⁷ Fe	1,09±0,44	2,00±0,31	4,65±1,51	1,27±0,15
⁶³ Cu	1,88±0,26	2,88±0,67	1,14±0,06	1,20±0,13

Da alle berechneten Verhältnisse (Tabelle 21) größer als eins sind kann festgehalten werden, dass die Elemente in Krebszellbereichen größere Intensitäten aufweisen als in Stromabereichen. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Zelldichte im Stroma, welches aus Fett- und Bindegewebe besteht, wesentlich geringer ist als in den Krebsgebieten. Dies zeigt sich neben der erhöhten Intensität des Elements Kohlenstoff, welcher einen großen Massenanteil in Zellgewebe ist, auch in den Verhältnissen der Elemente Phosphor und Schwefel. Diese sind als Heteroelemente in sehr vielen Proteinen und Enzymen gebunden.

Magalhaes [MAGALHAES *et al.* 2010] konnte in Untersuchungen an histologisch gesunden und neoplastischen Brustgewebe ebenfalls zeigen, dass die Konzentrationen der Elemente Phosphor, Schwefel, Eisen, Zink und Kupfer in dem Karzinomgewebe erhöht sind.

Bei dem Vergleich der Schwefelintensitätsverhältnisse ist zu sehen, dass das ID G1 und das IL G2 Karzinom annähernd identische Faktoren aufweisen, während das ID G2 und das ID G3 Mammakarzinom mit 12,72 und 12,64 eine deutliche

Intensitätszunahme der Krebszell- gegenüber der Stromabereiche aufzeigt. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit der ermittelten Zinkkonzentrationszunahme der ID G2 und ID G3 Karzinome.

Der wissenschaftlich diskutierte Effekt der zinkinduzierten Metallothioneinproduktion [MARET 2000] lässt anhand der ermittelten Messwerte die Vermutung diesbezüglich zu. Die hohe Schwefelintensität würde aus dem schwefelhaltigen Cystein resultieren, welches im Metallothionein gebunden ist.

Neben den anerkannten pathologischen Indikatoren dient Metallothionein (MT) in der Brustkrebsdiagnostik als prognostischer Biomarker [BAY *et al.* 2006]. So konnte Jin zeigen, dass die immunhistochemisch detektierten MT-Konzentration in invasiv duktalem G1 Mammakarziomen eine deutlich geringere Immunreaktion zeigten als bei einem G3 Karzinom [JIN 2002].

Um die Korrelation zwischen der Zink- und der Metallothioneinkonzentration zu bestätigen, müsste eine massenspektrometrische Speziationsanalyse durchgeführt werden.

Bezüglich der Schwefelintensitätszunahme kam Magalhaes [MAGALHAES *et al.* 2006] mit einer TXRF Analyse zu einem gleichen Ergebnis. Er ermittelte für das Krebsgewebe eine Schwefelkonzentration von 3240 ppm und für das gesunde Gewebe 295 ppm, was einem Verhältnis von 10,98 entspricht.

In Abbildung 79 sind die Intensitätsverhältnisse der Karzinomsubtypen einschließlich der Gradingfaktoren im Vergleich visualisiert. Eine signifikante Intensitätserhöhung ist bei den Elementen Phosphor, Schwefel und Eisen jeweils bei den Gradingfaktoren von zwei und drei detektiert worden.

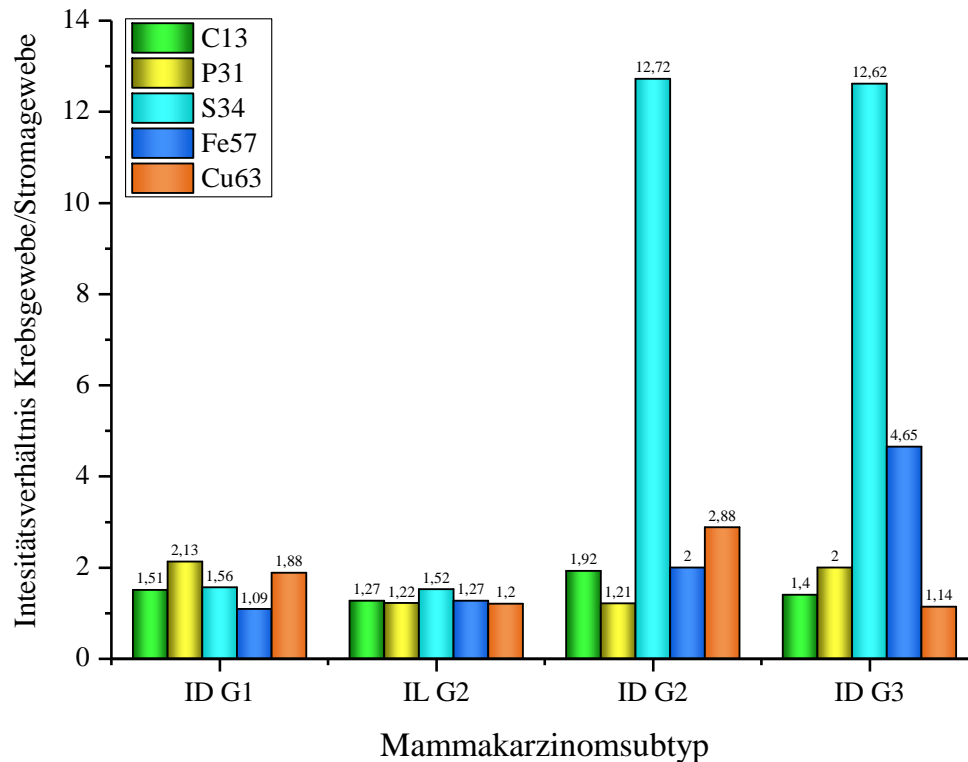


Abbildung 79: Berechnete Intensitätsverhältnisse zwischen Krebs- und Stromagewebe

Da die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen ausschließlich mit röntgenbasierten Analysemethoden (EDXRF = Energy Dispersive X-ray Fluorescence; SRIXE = Synchrotron Radiation-Induced X-ray Emission; TXRF = Total Reflection X-ray Fluorescence; PIXE = Particle Induced X-ray Emission) durchgeführt worden sind und neben dem Element Zink im Rahmen dieser Arbeit kein weiteres Element quantifiziert wurde, erfolgte für die Literaturdaten die Berechnung der entsprechenden Konzentrationsverhältnisse. Verglichen wurden Gewebeproben, welche mittels histologischer Untersuchungen als „normales“ oder als neoplastisches Gewebe klassifiziert werden konnten.

Tabelle 22: Literaturvergleich der ermittelten Eisen-Konzentrationen in Krebs- und Stromagewebe

		Gewebekonzentration [ppm]		
Autor	Methode	Fe Krebs	Fe Stroma	Verhältnis
Rizk et al. 1984	EDXRF	238,5±113,0	218,4±149,3	1,1
Geraki et al. 2002	SRIXE	18,84±15,59	11,58±10,92	1,63
Geraki et al. 2004	SRXRF	952±556	244±144	4,25
Magalhaes et al. 2006	TXRF/EDXRF	98±63/147±15	5±2/32±3	19,6/4,6
Naga Raju et al. 2006	PIXE	376,31±29,32	299,53±21,11	1,26
Majewska et al. 2007	EDXRF	23,6±16,7	13,3±10,4	1,8
Farquharson et al. 2008	SRXRF	15,6304±10,597	14,8433±2,76698	1,05
Silva et al. 2008	SRXRF	25,3	9	2,81

Die Konzentrationsverhältnisse der publizierten Arbeiten liegen in einem Wertebereich von 1,1-4,6 mit einer Ausnahme von 19,6. Hier zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den LA-ICP-MS Messwertverhältnissen von 1,06-4,65 (Tabelle 21, S.139). Da bisher in keiner wissenschaftlichen Untersuchung eine strukturierte, anhand der Mammakarzinomsubtypen und Gradingfaktoren klassifizierte Analyse durchgeführt worden ist, können lediglich die berechneten Faktorbereiche verglichen werden.

Außerdem ist anzumerken, dass die Konzentrationsangaben hinsichtlich der verschiedenen Analysemethoden, aber auch bei den gleichen Analysemethoden, zum Teil stark variieren. So ermittelte Geraki [GERAKI *et al.* 2004] an gefrorenen Gewebeproben eine Eisenkonzentration von 952 ppm, während Farquharson an FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) Gewebeproben eine Konzentration von 15,6 ppm ermittelte. Dies deutet die große Diskrepanz der publizierten Analysenergebnisse an, welche nicht nur auf die unterschiedliche Probenbearbeitung zurückzuführen ist. Naga Raju [NAGA RAJU *et al.* 2006] detektierte ebenfalls an gefrorenen Gewebeproben eine Eisenkonzentration von 376,31 ppm.

Für das Element Kupfer kann ebenfalls eine Übereinstimmung zwischen den berechneten Verhältnisse der röntgenbasierten und der massenspektrometrischen Analysen belegt werden.

Tabelle 23: Literaturvergleich der ermittelten Kupfer-Konzentrationen in Krebs- und Stromagewebe

Autor	Methode	Gewebekonzentration [ppm]		
		Cu Krebs	Cu Stroma	Verhältnis
Rizk et al. 1984	EDXRF	21,0±10,7	9,3±2,3	2,3
Geraki et al. 2002	SRIxE	0,89±0,56	0,29±0,29	3,07
Geraki et al. 2004	SRXRF	0,86±0,30	0,27±0,14	3,19
Magalhaes et al. 2006	TXRF/EDXRF	14±5/27±4	2±1/35±5	7,0/0,8
Naga Raju et al. 2006	PIXE	60,71±18,21	42,00±18,21	1,45
Majewska et al. 2007	EDXRF	0,969±0,571	1,200±0,842	0,81
Farquharson et al. 2008	SRXRF	4,17361±0,83	3,55828±0,641774	1,17
Silva et al. 2008	SRXRF	1,8	0,6	3,0

Die in Tabelle 23 aufgelisteten Verhältnisse zwischen Krebs- und Stromagewebe umfassen ein Wertespektrum von 0,81-7,0, welches mit den in dieser Arbeit ermittelten Faktorbereich von 1,14-2,88 (Tabelle 21, S.139) gut übereinstimmt. Jedoch variieren auch bei diesem Element, wie schon beim Literaturkonzentrationsvergleich des Zinks (Tabelle 19, S.120), die detektierten Konzentrationen von 0,86 ppm [GERAKI *et al.* 2004] bis zu 60,71 ppm [NAGA RAJU *et al.* 2006] für identisch behandelte Proben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die berechneten Intensitätsverhältnisbereiche der Elemente Schwefel, Eisen und Kupfer mit den in der Literatur aufgezeigten Werten übereinstimmt. Die große Varianz der Messwerte kann auf die subtypenunspezifischen Mammakarzinomanalysen zurückgeführt werden.

In Bezug auf die Elemente Schwefel, Eisen und Kupfer zeigt die Korrelation der Elementintensitäten zu den klassifizierten Proben (Abbildung 80), dass eine signifikante Zunahme hinsichtlich der Intensitäten bei Mammakarzinomen mit einem G2 und G3 Grading zu erkennen ist. Dies könnte, nach der Analyse eines größeren Probenkontingentes, zusammen mit der quantitativen Zinkbestimmung ein weiterer prognostischer Indikator im Rahmen der Brustkrebsdiagnose sein.

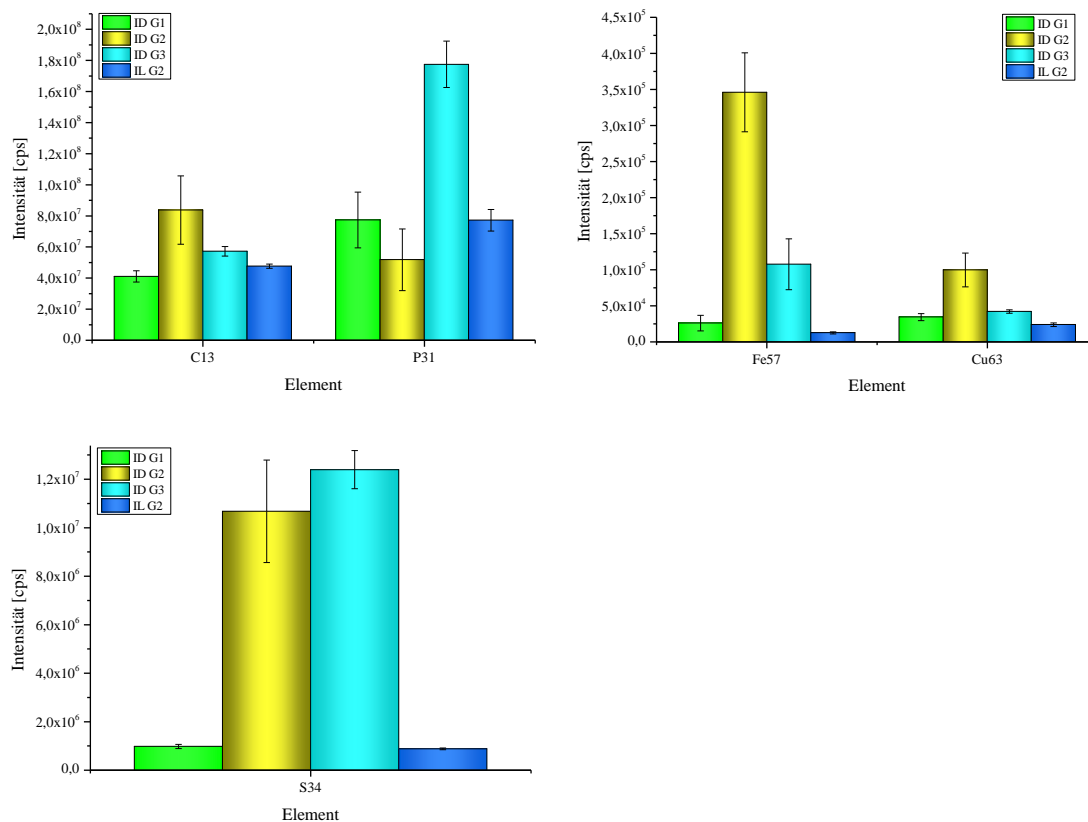


Abbildung 80: Intensitätsvergleich von Mammakarzinomsubtypen der Elemente C, P, S, Fe und Cu

4.5.3 Korrelation zwischen weiteren prognostischen Faktoren und der integrierten Zinksignalfläche

In der pathologischen Diagnostik wird neben dem Tumorgrading der Östrogen-, Progesteron-, HER-2- und Ki-67-Status bestimmt. Da diese Analysen entweder in einer prozentualen Angabe oder in einer Klassifizierung wie negativ oder positiv angegeben werden, ist eine orts aufgelöste Elementkorrelation nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Zinksignale der Gewebeproben integriert und auf die Anzahl der ablierten Linien normiert.

In Abbildung 81 sind die Prognosefaktoren Östrogen-, Progesteronrezeptor sowie Ki-67 und die integrierte Zinksignalfläche den untersuchten Mammakarzinomsubtypen zugeordnet. Während der Prozentsatz der östrogen- als auch progesteronrezeptorpositiven Zellen in den invasiv dukta len G1, G2 und den invasiv lobulären G2 Karzinomen mit 90%-100% annähernd identische Werte aufweisen, zeigen sich bei den invasiv dukta len G3 Karzinomen stark variierende Ergebnisse (Tabelle 29, S.201).

Die prozentuale Quantifizierung ergibt sich aus der Anzahl der Zellkerne, für die eine positive Immunreaktion ermittelt wurde. Nach der Durchmusterung des Gewebes, werden in den am stärksten eingefärbten Bereichen die Zellen eines Gesichtsfeldes gezählt und ein Verhältnis zwischen positiven Zellen und der Gesamtzellzahl gebildet. Diese Prozedur wird an vier unterschiedlichen Punkten durchgeführt und anschließend der arithmetische Mittelwert bestimmt, welcher als Proliferationsindex (Ki-67), bzw. als Maß der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression bezeichnet wird.

Farquharson konnte an invasiv dukta len Mammakarzinomen zeigen, dass die Zinkkonzentration von Östrogen-positiven Krebsgewebe eine ungefähr 80 % höhere Zinkkonzentration als das umliegenden krebsfreie Gewebe besitzt [FARQUHARSON *et al.* 2009]. Da in der vorliegenden Arbeit keine mikroskopischen Aufnahmen der Östrogen-positiven Zellverteilung in den Gewebeprobe erstellt worden sind, konnte keine orts aufgelöste Korrelation

zwischen der Östrogen-positiv exprimierten Zellen, den H&E gefärbten Krebszellen und der Zinkkonzentration durchgeführt werden.

In der zitierten Publikation wurde zwischen dem positiven oder negativen Östrogenstatus des Gesamtgewebes differenziert und anschließend die Zinkkonzentration der Krebszellen und des krebsfreien Gewebes verglichen.

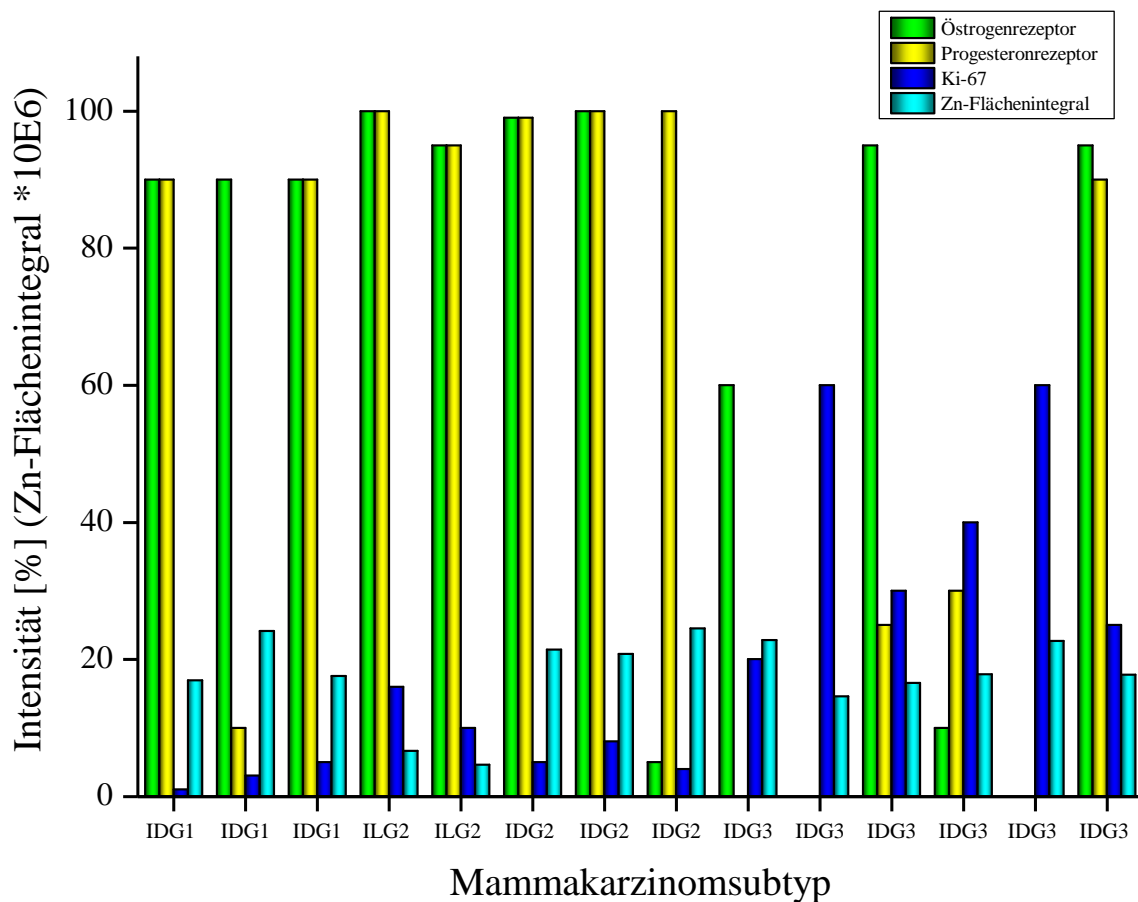


Abbildung 81: Vergleich des Zn-Flächenintegrals, des Östrogen-, Progesteron- und Ki-67 Status der unterschiedlichen Mammakarzinomsubtypen

Die Messwerte des Wachstumsfaktors Ki-67 zeigen bezüglich der ID G1-, ID G2- und IL G2-Mammakarzinome mit einem Spektrum von 1%-16% große Unterschiede auf. Außerdem ist zu sehen, dass die Messwerte der ID G3 Karzinome deutlich erhöht sind, wobei auch bei diesen prozentualen Angaben eine große Varianz zu verzeichnen ist (siehe Tabelle 24, S.148).

Die Flächenintegrale der Zinkintensitäten für die invasiv lobulären G2 Mammakarzinome zeigen niedrigere Werte als die der anderen Subtypen, während die duktaalen Mammakarzinome ähnliche Integralergebnisse besitzen, jedoch kein eindeutiger Trend zu erkennen ist.

Tabelle 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von HER-2, MT, Ki-67 und dem integrierten Flächensignal des Elements Zink. An den freien Stellen wurde keine MT Messung durchgeführt

Diagnose	HER-2	MT	Ki-67	Integriertes Flächensignal von Zink
ID G1	negativ	negativ	1	1,69E+07
ID G1	negativ	negativ	3	2,41E+07
ID G1	negativ	negativ	5	1,75E+07
IL G2	negativ	negativ	16	6,61E+06
IL G2	negativ	negativ	10	4,61E+06
ID G2	negativ	positiv	5	2,14E+07
ID G2	negativ	negativ	8	2,08E+07
ID G2	negativ	negativ	4	2,45E+07
ID G3	3+ positiv	-	20	2,28E+07
ID G3	negativ	negativ	60	1,46E+07
ID G3	negativ	-	30	1,65E+07
ID G3	negativ	-	40	1,78E+07
ID G3	negativ	-	60	2,26E+07
ID G3	negativ	-	25	1,77E+07

Die in Tabelle 24 aufgelisteten Ergebnisse der HER-2- und MT- Analysen zeigen in beiden Untersuchungen jeweils nur eine positiv detektierte Probe. Alle anderen Messungen ergaben negative Ergebnisse. Dies steht bezüglich der immunhistochemischen Analyse des Metallothionein in Gegensatz zu den

signifikant erhöhten Schwefelintensitäten der ID G2 und G3 Mammakarzinome. Eine Begründung hierfür ist, dass die Sensitivität der histochemischen Methode nicht ausreicht, um das Metallothionein in histologischen Schnitten von Tumorgewebe zu detektieren.

Abschließend kann man festhalten, dass weder die Östrogen- und Progesteronrezeptoren noch das Ki-67 Antigen mit dem ermittelten Flächenintegralen des Elements Zink korrelieren. Außerdem fällt die HER-2 und MT Analyse bis auf zwei Ausnahmen negativ aus.

Es ist jedoch anzumerken, dass zu einer Ergebnisbestätigung mit statistischer Signifikanz ein größeres Probenkollektiv untersucht werden muss.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Anwendung der LA-ICP-MS in Bezug auf die orts aufgelöste Elementdetektion in Mammakarzinomen etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass dies gegenüber der bisher verwendeten Synchrotron-Fluoreszenzspektroskopie aufgrund einer besseren Verfügbarkeit der Messanlagen, geringeren Analysenzeiten und besserer Nachweisempfindlichkeit eine sehr gute Alternative darstellt. Der quantitative Messwertvergleich der beiden Methoden führt für das Element Zink zu vergleichbaren Zinkkonzentrationen.

Außerdem wurde erfolgreich eine Software zur Auswertung der massenspektrometrisch ermittelten Daten entwickelt, welche die Bearbeitung der Messwerte deutlich vereinfacht. Der Nachweis konnte bereits durch die Implementierung in die Messroutine erbracht werden.

Der Einsatz der μ -RFA als Komplementärmethode hat gezeigt, dass die Empfindlichkeit hinsichtlich der untersuchten Metalle Zink, Eisen und Kupfer nicht gegeben war. Es konnte jedoch illustriert werden, dass die Korrelation der Konturplots für die Proteinheteroelemente Phosphor und Schwefel als kongruent betrachtet werden können.

Die Korrelationsanalyse der orts aufgelösten Zinkkonzentration mit den H&E gefärbten Gewebeschnitten zeigte eine hervorragende Übereinstimmung. Außerdem konnte der in der Literatur beschriebene Konzentrationsunterschied zwischen dem Krebszell- und Stromagewebe des Elements Zink bestätigt werden. Es wurde eine klare und detaillierte Bereichsabgrenzung zwischen den beiden unterschiedlichen Geweben nachgewiesen.

Die erstmals in dieser Form durchgeführte Mammakarzinomanalyse hat gezeigt, dass anhand der Zinkkonzentration eine Differenzierung zwischen lobulären und dukталen Mammakarzinomen durchgeführt werden kann. Des Weiteren konnte

dargelegt werden, dass der histopathologische Malignitätsgrad bei einem invasiv duktalem Mammakarzinom direkt mit der Zinkkonzentration bestimmt werden kann. Hier zeigte sich eine signifikante Konzentrationszunahme mit steigenden Gradingfaktor.

Die Ergebnisse der prognostischen Faktoren Östrogen-, Progesteronrezeptor, HER-2, MT und Ki-67 ließen, bis auf eine schwache Korrelation zwischen dem Proliferationsfaktor Ki-67 und der bei ID G3 Karzinomen erhöhten Zinkkonzentration, keinen weiteren Erkenntnisgewinn zu.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Korrelation der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink durch die anschließender Streudiagramm- und Regressionsanalyse bestätigt werden konnte. So kann festgehalten werden, dass neben der Zinkanreicherung in den Krebszellbereichen eine Intensitätszunahme von Phosphor und Schwefel erfolgt.

Zur Bestätigung der Forschungsergebnisse und der daraus resultierenden Möglichkeit, den histopathologischen Malignitätsgrad anhand der Zinkkonzentration vorherzusagen, müssen noch mehr Analysen an einem größeren Probenkontingent durchgeführt werden.

Für weitere Untersuchungen wäre vor allem eine orts aufgelöste Korrelation zwischen Zink und anderen prognostischen Faktoren wie dem Östrogen-, Progesteronrezeptor- oder dem HER-2-Status interessant. Die praktische Umsetzung könnte ebenfalls als Korrelationsanalyse zwischen den Elementkonturplots und den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten erfolgen.

Im Rahmen der Korrelation zwischen μ -RFA und LA-ICP-MS wäre ein Optimierungsschritt hinsichtlich der röntgenspektroskopischen Methode, die Verwendung von Proben mit einer Schichtdicke von mehr als 10 μm . Dadurch

bestünde durch die größere Analytmenge eventuell die Möglichkeit, auch die Metalle mit der μ -RFA analysieren zu können.

Außerdem könnte die Korrelation zwischen den Elementen Phosphor, Schwefel und Zink gerade in Bezug auf die Elemente Zink und Schwefel mittels einer elementspezifischen Methode beleuchtet werden. Hier könnte man der Frage nachgehen, welche Zinkspezies in den krebszellkorrelierten Bereichen der Gewebeproben existieren. Dieser Ansatz würde eine native Proteinextraktion mit einer chromatographischen Trennung und abschließender massenspektrometrischer Detektion beinhalten.

6. Literaturverzeichnis

Al-Ebraheem, A.; Goettlicher, J.; Geraki, K.; Ralph, S.; Farquharson, M. J., The determination of zinc, copper and iron oxidation state in invasive ductal carcinoma of breast tissue and normal surrounding tissue using XANES, X-Ray Spektrom., 39 (5), 332–337, 2010.

Allred, D. Craig, Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer, Mod. Pathol., 23, 52-59, 2010.

Anderson, Elizabeth, The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis, Breast cancer research, 4 (5), 197–201, 2002.

Andreini, Claudia; Banci, Lucia; Bertini, Ivano; Rosato, Antonio, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome, Journal of proteome research, 5 (1), 196–201, 2006.

Arpino, Grazia; Bardou, Valerie J.; Clark, Gary M.; Elledge, Richard M., Infiltrating lobular carcinoma of the breast - tumor characteristics and clinical outcome, Breast cancer research, (6), 149–156, 2004.

Arslan, P. Di V. F. Beltrame M. Tsien R. Y. & Pozzan T., Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} , J. Biol. Chem., (260), 2719–2727, 1985.

Austin, Christine; Fryer, Fred; Lear, Jessica; Bishop, David; Hare, Dominic; Rawling, Tristan; Kirkup, Les; McDonagh, Andrew; Doble, Philip, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissue by LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26, 1494–1501, 2011.

Austin, Christine; Hare, Dominic; Rawling, Tristan; McDonagh, Andrew M.; Doble, Philip, Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (5), 722–725, 2010.

Bay, Boon-Huat; Jin, Rongxian; Huang, Jingxiang; Tan, Puay-Hoon, Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer, *Experimental biology and medicine*, 231 (9), 1516–1521, 2006.

Becker, J. S.; Becker, J. Su; Zoriy, M. V.; Dobrowolska, J.; Matusch, A., Imaging mass spectrometry in biological tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *European journal of mass spectrometry*, 13 (1), 1–6, 2007.

Becker, J. Sabine; Kumtabtim, Usarat; Wu, Bei; Steinacker, Petra; Otto, Markus; Matusch, Andreas, Mass spectrometry imaging (MSI) of metals in mouse spinal cord by laser ablation ICP-MS, *Metallomics*, 4 (3), 284, 2012.

Becker, J. S.; Matusch, A.; Depboylu, C.; Dobrowolska, J.; Zoriy, M. V., Quantitative Imaging of Selenium, Copper, and Zinc in Thin Sections of Biological Tissues (Slugs–Genus *Arion*) Measured by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 79 (16), 6074–6080, 2007.

Becker, J. Sabine; Zoriy, Miroslav; Becker, J. Susanne; Dobrowolska, Justina; Matusch, Andreas, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (7), 736-744, 2007.

Becker, J. Sabine; Zoriy, Miroslav; Krause-Buchholz, Udo; Becker, J. Susanne; Pickhardt, Carola; Przybylski, Michael; Pompe, Wolfgang; Rödel, Gerhard, In-gel screening of phosphorus and copper, zinc and iron in proteins of yeast mitochondria by LA-ICP-MS and identification of phosphorylated protein structures by MALDI-FT-ICR-MS after separation with two-dimensional gel electrophoresis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (9), 1236-1243, 2004.

Becker, J. Sabine; Zoriy, Miroslav; Wu, Bei; Matusch, Andreas; Becker, J. Susanne, Imaging of essential and toxic elements in biological tissues by LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (9), 1275-1280, 2008.

Becker, Johanna Sabine, Inorganic mass spectrometry. Principles and applications, John Wiley & Sons., Chichester, England, 2007.

Beckhoff, B., Handbook of practical X-ray fluorescence analysis, Springer Verlag, Berlin, New York, 2006.

Bellis, David J.; Santamaria-Fernandez, Rebeca, Ink jet patterns as model samples for the development of LA-ICP-SFMS methodology for mapping of elemental distribution with reference to biological samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (7), 957-963, 2010.

Bishop, Glenda M.; Dringen, Ralf; Robinson, Stephen R., Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes, *Free radical biology & medicine*, 42 (8), 1222–1230, 2007.

Bleiner, Davide, Mathematical modelling of laser-induced particulate formation in direct solid microanalysis, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60 (1), 49–64, 2005.

Bleiner, Davide; Bogaerts, Annemie, Computer simulations of laser ablation sample introduction for plasma-source elemental microanalysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (11), 1161, 2006.

Bloom H. J.; Richardson W. W., Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years, *Br. J. Cancer*, (11), 359–377, 1957.

Böcker, W.; Decker, T., Pathologie des invasiven Mammakarzinoms, *Der Onkologe*, 14 (5), 443–453, 2008.

Bogaerts, Annemie; Chen, Zhaoyang; Gijbels, Renaat; Vertes, Akos, Laser ablation for analytical sampling: what can we learn from modeling?, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58 (11), 1867–1893, 2003.

Borrello, S.; Leo, M. E. de; Galeotti, T., Defective gene expression of MnSOD in cancer cells, *Molecular aspects of medicine*, 14 (3), 253–258, 1993.

Boulyga, Sergei F.; Pickhardt, Carola; Becker, J. Sabine, New approaches of solution-base calibrations in LA-ICP-MS, *Atomic Spectroscopy*, 2 (25), 53–101, 2004.

Carvalho, M. L.; Magalhaes, T.; Becker, M.; Bohlen, A. von, Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62 (9), 1004–1011, 2007.

Chaurand, Pierre; Latham, Joey C.; Lane, Kirk B.; Mobley, James A.; Polosukhin, Vasiliy V.; Wirth, Pamela S.; Lillian B. Nanney, Lillian B. and Caprioli Richard M., Imaging Mass Spectrometry of Intact Proteins from Alcohol-Preserved Tissue Specimens: Bypassing Formalin Fixation, *Journal of proteome research*, (7), 3543–3555, 2008.

Clarke, Robert B., Steroid receptors and proliferation in the human breast, *Steroids*, 68 (10-13), 789–794, 2003.

da Silva, Marina Piacenti; da Silva, Deisy Mara; Ribeiro-Silva, Alfredo; Poletti, Martin Eduardo, Correlations of trace elements in breast human tissue evaluation of spatial distribution using μ -XRF, *American Institute of Physics*, (1437), 45–49, 2012.

Durrant, Steven F., Multi-elemental analysis of environmental matrices by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *The Analyst*, 117 (10), 1585–1592, 1992.

Durrant, Steven F.; Ward, Neil I., Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry

(LA-ICP-MS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9), 821–829, 2005.

Ellis, I.O.; Galea, M.; Broughton, N.; Locker, A.; Blamey, R.W.; Elston, C.W., Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up, *Histopathology*, 20 (6), 479–489, 1992.

Elston C W, Ellis I. O., Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up, *Histopathology*, (19), 403–410, 1991.

Farquharson, M. J.; Al-Ebraheem, A.; Falkenberg, G.; Leek, R.; Harris, A.L; Bradley, D.A, The distribution of trace elements Ca, Fe, Cu and Zn and the determination of copper oxidation state in breast tumour tissue using μ SRXRF and μ XANES, *Physics in medicine and biology*, (53), 3023–3037, 2008.

Farquharson, M. J.; Al-Ebraheem, A.; Geraki, K.; Leek, R.; Harris, A. L., Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status, *Physics in medicine and biology*, 54 (13), 4213–4223, 2009.

Feldmann, Jörg; Kindness, Andrew; Ek, Paul, Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (8), 813–818, 2002.

Finney, L. A., Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors, *Science*, 300 (5621), 931–936, 2003.

Gamaly, E. G.; Rode, A. V.; Luther-Davies, B.; Tikhonchuk, V. T., Ablation of solids by femtosecond lasers: Ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics, *Physics of Plasmas*, 9 (3), 949-958, 2002.

Gasco, Milena; Shami, Shukri; Crook, Tim, The p53 pathway in breast cancer, *Breast Cancer Res*, (4), 70–76, 2002.

Geraki, K.; Farquharson, M. J.; Bradley, D. A., Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study, *Physics in medicine and biology*, 47 (13), 2327–2339, 2002.

Geraki, K.; Farquharson, M. J.; Bradley, D. A., X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue, *Physics in medicine and biology*, 49 (1), 99–110, 2004.

Giesen, Charlotte; Mairinger, Thomas; Khoury, Lina; Waentig, Larissa; Jakubowski, Norbert; Panne, Ulrich, Multiplexed Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Breast Cancer Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 83 (21), 8177–8183, 2011.

Goldhirsch, A.; Wood, W. C.; Gelber, R. D.; Coates, A. S.; Thurlimann, B.; Senn, H.-J, Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007, *Annals of Oncology*, 18 (7), 1133–1144, 2007.

Guillong, M.; Horn, I.; Günther, D., A comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state Nd:YAG laser for laser ablation ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 (10), 1224, 2003.

Guillong, Marcel; Kuhn, Hans-Rudolf; Günther, Detlef, Application of a particle separation device to reduce inductively coupled plasma-enhanced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58 (2), 211–220, 2003.

Haase, H.; Beyersmann, D., Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 12 (3), 247–254, 1999.

Hare, Dominic J.; George, Jessica L.; Grimm, Rudolph; Wilkins, Simon; Adlard, Paul A.; Cherny, Robert A.; Bush, Ashley I.; Finkelstein, David I.; Doble, Philip, Three-dimensional elemental bio-imaging of Fe, Zn, Cu, Mn and P in a 6-hydroxydopamine lesioned mouse brain, *Metallomics*, 2 (11), 745-753, 2010.

Harilal, S. S.; Bindhu, C. V.; Tillack, M. S.; Najmabadi, F.; Gaeris, A. C., Internal structure and expansion dynamics of laser ablation plumes into ambient gases, *Journal of Applied Physics*, 93 (5), 2380-2388, 2003.

Harris, Jay R., *Diseases of the breast*. 4. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010.

Harris, L.; Fritsche, H.; Mennel, R.; Norton, L.; Ravdin, P.; Taube, S.; Somerfield, M. R.; Hayes, D. F.; Bast, R. C., American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33), 5287–5312, 2007.

Hartwig A., Recent advances in metal carcinogenicity, *Pure and Applied Chemistry*, (6), 1007–1014, 2000.

Hauer, M.; Funk, D.J; Lippert, T.; Wokaun, A., Time resolved study of the laser ablation induced shockwave, *Thin Solid Films*, 453-454, 2004.

Hayat, M. A., *Methods of cancer diagnosis, therapy and prognosis, Breast carcinoma*, Springer Verlag, Dordrecht, London, 2008.

Hinds, William C., *Aerosol technology. Properties, behavior, and measurement of airborne particles*, Wiley, 2. Aufl. New York, 1999.

Horng, J.-C; Kotch, F. W.; Raines, R. T., Is glycine a surrogate for a D-amino acid in the collagen triple helix?, *Protein Science*, 16 (2), 208–215, 2006.

Jackson, Brian; Harper, Steve; Smith, Laura; Flinn, Jane, Elemental mapping and quantitative analysis of Cu, Zn, and Fe in rat brain sections by laser ablation ICP-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (4), 951–957, 2006.

Jin, R., Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer, *Carcinogenesis*, 23 (1), 81–86, 2002.

Kamaly, Nazila; Pugh, John A.; Kalber, Tammy L.; Bunch, Josephine; Miller, Andrew D.; McLeod, Cameron W.; Bell, Jimmy D., Imaging of Gadolinium Spatial Distribution in Tumor Tissue by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Molecular Imaging and Biology*, 12 (4), 361–366, 2010.

Koch, J.; Bohlen, A. von; Hergenröder, R.; Niemax, K., Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2), 267-272, 2004.

Koch, J.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Niemax, K., Elemental composition of laser ablation aerosol particles deposited in the transport tube to an ICP, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57 (5), 975–985, 2002.

Koch, J.; Schlamp, S.; Rosgen, T.; Fliegel, D.; Günther, D., Visualization of aerosol particles generated by near infrared nano- and femtosecond laser ablation, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, (19), 267–272, 2007.

Koch, J.; Schlamp, S.; Rösigen, T.; Fliegel, D.; Günther, D., Visualization of aerosol particles generated by near infrared nano- and femtosecond laser ablation, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62 (1), 20–29, 2007.

Kroslakova, I.; Günther, D., Elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: evidence for mass load induced matrix effects in the ICP during ablation of a silicate glass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (1), 51–62, 2006.

Kuhn, H.-R; Günther, D., Elemental Fractionation Studies in Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry on Laser-Induced Brass Aerosols, *Analytical Chemistry*, 75 (4), 747–753, 2003.

Kuhn, H.-R.; Koch, J.; Hergenröder, R.; Niemax, K.; Kalberer, M.; Günther, D., Evaluation of different techniques for particle size distribution measurements on laser-generated aerosols, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9), 894–900, 2005.

Kuhn H., Günther D., Laser ablation-ICP-MS: particle size dependent elemental composition studies on filter-collected and online measured aerosols from glass, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (19), 1158–1164, 2004.

Lakhani, Sunil R., WHO classification of tumours of the breast, 4. Aufl., IARC, Lyon, 2012.

Lear, Jessica; Hare, Dominc; Adlard, Paul; Finkelstein, David; Doble, Philip, Improving acquisition times of elemental bio-imaging for quadrupole-based LA-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (1), 159–164, 2012.

Li, Yue; Shrestha, Bindesh; Vertes, Akos, Atmospheric pressure molecular imaging by infrared MALDI mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 79 (2), 523–532, 2007.

Lobinski, Ryszard; Becker, J. Sabine; Haraguchi, Hiroki; Sarkar, Bibundhendra, Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 82 (2), 493–504, 2010.

Loh, Stewart N., The missing Zinc: p53 misfolding and cancer, *Metallomics*, 2 (7), 442–449, 2010.

Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W., Bioanalytik, 2. Aufl., Elsevier Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg München, 2006.

Magalhaes, T.; Bohne, A.; Carvalho, M.L; Becker, M., Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry*, (61), 1185–1193, 2006.

Magalhães, T.; Carvalho, M.L; Bohlen, A. von; Becker, M., Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry*, (65), 493–498, 2010.

Majewska, Urszula; Banas, Dariusz; Braziewicz, Janusz; Gozdz, Stanislaw; Kubala-Kukus, Aldona; Kucharzewski, Marek, Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues, *Physics in medicine and biology*, 52 (13), 3895–3911, 2007.

Mao, Samuel S.; Mao, Xiang-Lei; Greif, Ralph; Russo, Richard E., Simulation of infrared picosecond laser-induced electron emission from semiconductors, *Applied Surface Science*, 127-129, 206–211, 1998.

Maret, W., The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state, *The Journal of nutrition*, 130 (5), 1455-1458, 2000.

Maret, Wolfgang, Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals, *BioMetals*, 22 (1), 149–157, 2009.

Maret W., Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc, *Experimental gerontology*, (43), 363–369, 2008.

McCabe, M. J.; Jiang, S. A.; Orrenius, S., Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 69 (1), 101–110, 1993.

Moinfar, Farid, *Essentials of diagnostic breast pathology. A practical approach*, Springer Verlag, Berlin, 2007.

Mukhopadhyay, C. K.; Fox, P. L., Ceruloplasmin copper induces oxidant damage by a redox process utilizing cell-derived superoxide as reductant, *Biochemistry*, 37 (40), 14222–14229, 1998.

Müller, Sebastian D.; *Einsatz der Laser-Ablation und Plasma-Massenspektrometrie zum Proteinnachweis und zur Gewebeuntersuchung*, 2005.

Müller, Sebastian D.; *Methodenentwicklung zur orts aufgelösten Untersuchung und Elementquantifizierung von Gewebeschnitten und von cis-Platin behandelten CHO-Zellen mittels Plasma-Massenspektrometrie nach Laser-Ablation*, 2012.

Naga Raju, G. J.; Sarita, P.; Ravi Kumar, M.; Ramana Murty, G.A.V; Seetharami Reddy, B.; Lakshminarayana, S.; Vijayan, V.; Rama Lakshmi, P.V.B; Satyanarayana Gavarasana; Bhuloka Reddy, S., Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique, *Nuclear instruments & Methods in physics research section B: Beam interactions with materials and atoms.*; 247 (2), 361–367, 2006.

Ng, K. H.; Bradley, D. A.; Looi, L. M., Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues, *The British journal of radiology*, 70 (832), 375–382, 1997.

National Institut of Standard & Technology Certificate of Analysis.

Osselmann, Klaus; Entwicklung einer neuen Auswertemethode für die ortsauflöste Elementdetektion mittels LA-ICP-MS, 2011.

Parkin, Gerard, The bioinorganic chemistry of zinc: synthetic analogues of zinc enzymes that feature tripodal ligands, Chemical Communications, (20), 1971–1985, 2000.

Patey D H, Scarff R. W., The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast, Lancet, (1), 801–804, 1928.

Perdian, D. C.; Bajic, Stanley J.; Baldwin, David P.; Houk, R. S., Time-resolved studies of particle effects in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 23 (3), 325-335, 2008.

Pickhard C.; Izmer A.V.; Zoriy M.V.; Schaumlöffel D; Becker S., On-line isotope dilution in laser ablation ICP MS by microflow nebulizer, Int. J. Mass Spectrom., (248), 131–141, 2006.

Pozebon, Dirce; Dressler, Valderi L.; Mesko, Marcia Foster; Matusch, Andreas; Becker, J. Sabine, Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online quantification strategy using aqueous standards, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25 (11), 1739-1744, 2010.

Prasad, A. S., Zinc: an overview, Nutrition, 11 (1), 93–99, 1995.

Prasad, Ananda S., Zink in human health: An update, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* (11), 63–87, 1998.

Pugh, J.A.T; Cox, A.G; McLeod, C.W; Bunch; J.; Gordon, B.; Kalber, T.; White, E., A novel calibration strategy for analysis and imaging of biological thin sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (26), 1667–1673, 2011.

Qin, Zhenyu; Caruso, Joseph A.; Lai, Barry; Matusch, Andreas; Becker, J. Sabine, Trace metal imaging with high spatial resolution: Applications in biomedicine, *Metallomics*, 3 (1), 28-37, 2011.

Rege, Sonal; Jackson, S.; Griffin, W. L.; Davies, R. M.; Pearson, N. J.; O'Reilly, Suzanne Y., Quantitative trace-element analysis of diamond by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (7), 601-611, 2005.

Rizk, Sherif L.; Sky-Peck, Howard H., Comparison between concentration of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue, *Cancer Research*, (44), 5390–5394, 1984.

Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebs in Deutschland 2007/2008, 2012.

Rodushkin, Ilia; Axelsson, Mikael D.; Malinovsky, Dmitry; Baxter, Douglas C., Analyte- and matrix-dependent elemental response variations in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (10), 1223–1230, 2002.

Saetveit, Nathan J.; Bajic, Stanley J.; Baldwin, David P.; Houk, R. S., Influence of particle size on fractionation with nanosecond and femtosecond laser ablation in brass by online differential mobility analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (1), 54-61, 2007.

Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, 391 (6662), 96–99, 1998.

Sauer, Georg; Deissler, Helmut; Kurzeder, Christian; Kreienberg, Rolf, New Molecular Targets of Breast Cancer Therapy, *Strahlentherapie und Onkologie*, 178 (3), 123–133, 2002.

Schwedt, Georg, *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis*, 2. Aufl., Wiley-VCH-Verl., Weinheim, 2008.

Setou, Mitsutoshi, *Imaging Mass Spectrometry*, Springer Verlag, Tokyo Japan, 2010.

Silva, M. P.; Tomal, A.; Pérez, C. A.; Ribeiro-Silva, A.; Poletti, M. E., Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues, *X-Ray Spectrometry*, 38 (2), 103–111, 2008.

Statistische Bundesamt, Jeder Vierte starb 2010 an Krebs, Pressemitteilung vom 3. Februar 2012-41/42.

Szpunar, Joanna, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *The Analyst*, 130 (4), 442, 2005.

Triglav, Jure; van Elteren, Johannes T.; Šelih, Vid S., Basic Modeling Approach To Optimize Elemental Imaging by Laser Ablation ICP-MS, *Analytical Chemistry*, 82 (19), 8153–8160, 2010.

Urgast, Dagmar S.; Ellingsen, Dag G.; Berlinger, Balázs; Eilertsen, Einar; Friisk, Grete; Skaug, Vidar; Thomassen, Yngvar; Beattie, John H.; Kwun, In-Sook; Feldmann, Jörg, Multi-elemental bio-imaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404 (1), 89–99, 2012.

Venkatachalam, A.; Koehler, C. U.; Feldmann, I.; Lampen, P.; Manz, A.; Roos, P. H.; Jakubowski, N., Detection of phosphorylated proteins blotted onto membranes using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (9), 1023-1032, 2007.

Wätjen, Wim; Haase, Hajo; Biagioli, Marta; Beyersmann, Detmar, Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc, *Environ Health Perspect*, (110), 865–867, 2002.

Zoriy, Myroslav V.; Dehnhardt, Markus; Matusch, Andreas; Becker, J. Sabine, Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63 (3), 375–382, 2008.

7. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxosulfat
CRM	Certified Reference Material
CCD	Charge-coupled Device
cps	counts per second
Ck	Cytokeratin
DNA	Deoxyribonucleic acid
dpi	dots per inch
DCIS	Ductal Carcinoma in Situ
EDXRF	Energy-dispersive X-Ray fluorescence spectroscopy
ER	Estrogen receptor
fs	Femtosekunden
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
g	Gramm
GUI	graphical user interface
H&E	Hematoxylin und Eosin
HPLC	high performance liquid chromatography
HER 2	human epidermal growth factor receptor 2
IF	image factor
ICP-AES	induktiv gekoppeltes Plasma-Atomemissionsspektrometer
IS	Interner Standard
IDC	invasive ductal carcinoma
ILC	invasive lobulare carcinoma
kg	Kilogramm
Ki-67	Antigen Ki-67
LA-ICP-MS	Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer
m	Masse

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MHz	Megahertz
MT	Metallothionein
mg	Milligramm
ms	Millisekunden
Nd:YAG Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat Laser
PIXE	Particle-Induced X-Ray Emission
ppm	parts per million
PR	Progesteron receptor
P/A Faktoren	Pulsmodus/Analogmodus Faktor
ROS	reactive oxygen species
SEM	scanning electron microscopy
SIMS	secondary ion mass spectrometry
SSD	silicon drift detector
SOD	Superoxiddismutase
SRIXE	synchrotron radiation induced x-ray emission
SRXRF	synchrotron radiation x-ray fluorescence spectroscopy
TPEN	N,N,N',N'-terakis-(2-pyridylmethyl)ethyldiamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TXRF	total reflection x-ray fluorescence
TEM-EDS	transmission electron microscopy – energy dispersive spectrometry
TNM	Tumorgröße (T), regionäre Lymphknoten (N), Fernmetastasen (M)
V	Volumen
WHO	World health organisation
XANES	X-ray absorption near-edge structure spectroscopy
μ-XRF	ortsaufösendes Röntgenfluoreszenzspektroskop

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2008 [Krebs in Deutschland 2007/2008]	10
Abbildung 2: Hypothetisches Modell der Mammakarzinomentwicklung auf der Grundlage des Progenitorzellkonzepts [BÖCKER UND DECKER 2008]	12
Abbildung 3: Ein mit H&E gefärbter Gewebeschnitt eines invasiv lobulären Mammakarzinoms. Die Krebszellen sind dunkel blau gefärbt.	13
Abbildung 4: H&E gefärbter Gewebeschnitt eines invasiv duktales Mammakarzinoms. Die Krebszellen sind dunkel blau gefärbt.	14
Abbildung 5: Analytische Methoden und deren laterale Auflösung und Nachweisgrenzen [Beckhoff 2006]	23
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines LA-ICP-MS [Becker 2007]	25
Abbildung 7: Schematische Abbildung der Photonen-Feststoff Wechselwirkung während der Laser-Ablation. [BECKER 2007]	28
Abbildung 8: Partikelgrößenverteilung eines mittels Laser-Ablation erzeugten Aerosols einer Messingprobe. Für die Generierung wurde ein ArF-Excimer-Laser (193 nm) mit einem Laserstrahldurchmesser von 63 µm, eine Frequenz von 10 Hz und einer Energiedichte von 15 J/cm ² verwendet. [KUHN et al. 2005]	31
Abbildung 9: Ermittlung des Start- und Endpunktes der Linienablations	37
Abbildung 10: LA-ICP-MS Datenauswertung eines Gewebeschnittes mit der von Müller entwickelten Auswertemethode	40
Abbildung 11: Neu entwickelte Auswertesoftware für die LA-ICP-MS. In der Abbildung ist die Auswertung einer Druckerprobe zu sehen.	41
Abbildung 12: Druckerprobe für die Machbarkeitsstudie der Auswertesoftware	42
Abbildung 13: Plasmafackel eines ICP-MS [Schwedt 2008]	44
Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer ICP-MS [Agilent Technologies]	44
Abbildung 15: Aufbau eines Quadrupolmassenfilters [LOTTSPREICH 2006].	46

Abbildung 16: Anregung eines kernnahen Elektrons durch die Wechselwirkung mit der Röntgenstrahlung [Quelle: Fachhochschule Nürnberg, Fakultät Werkstofftechnik, 2012]	48
Abbildung 17: Polykapillare Optik zur Fokussierung der Röntgenstrahlen	49
Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer μ -RFA. a) Röntgenröhre; b) Polykapillare; c) Probentisch mit Probe; d) Fluoreszenzstrahlung; e) Detektor [Quelle: Bruker Nano Berlin, 2012]	50
Abbildung 19: Druckmuster zur Methodenoptimierung des LA-ICP-MS	57
Abbildung 20: Kryoablationskammer mit einem fixierbaren Aluminiumeinsatz des LA-ICP-MS Systems	60
Abbildung 21: Auswertung der LA-ICP-MS Daten: ^{63}Cu -Intensitäten einer Linienabtastung (links), mit LA-ICP-MS UniDuE berechneter Konturplot des Elements Kupfer	69
Abbildung 22: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Messzeit von 0,05 s pro Isotop (Laserstrahldurchmesser 200 μm , Ablationsgeschwindigkeit 50 $\mu\text{m/s}$)	73
Abbildung 23: CCD-Kameraaufnahme der Druckerprobe in der Ablationskammer	74
Abbildung 24: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Messzeit von 0,1 s pro Isotop (Laserstrahldurchmesser 200 μm , Ablationsgeschwindigkeit 50 $\mu\text{m/s}$)	75
Abbildung 25: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einem Laserstrahldurchmesser von 125 μm	76
Abbildung 26: Ausschnitt der Druckerprobe des Kreises mit dem Radius 0,2 cm	77
Abbildung 27: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einem Laserstrahldurchmesser von 200 μm	77
Abbildung 28: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Ablationsgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{m/s}$	79

Abbildung 29: Methodenoptimierung mit einer Druckerprobe. LA-ICP-MS Messung mit einer Ablationsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$	80
Abbildung 30: Detektierte Kupferintensitäten einer Linienablation mit einem Laserstrahldurchmesser von 200 μm , einer Ablationsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$ und einer Messzeit pro m/Z Verhältnis von 0,1 s. Links von Linie 23 und rechts von Linie 36 des Konturplots.	81
Abbildung 31: Vergleich der Abbildungsfaktoren bei 0,1 s (links) und 0,05 s (rechts) Messzeiten pro m/Z Verhältnis	83
Abbildung 32: Detektierte Messwerte bei der LA-ICP-MS Analyse der matrixangepassten Kalibrationsstandards	85
Abbildung 33: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms	91
Abbildung 34: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms	92
Abbildung 35: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktales G1 Mammakarzinomschnitt	93
Abbildung 36: Ausschnitt des Zink-Konturplots eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms	94
Abbildung 37: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	95
Abbildung 38: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	96
Abbildung 39: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktales G2 Mammakarzinomschnitt	97
Abbildung 40: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	98
Abbildung 41: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	99
Abbildung 42: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktales G3 Mammakarzinomschnitt	100

Abbildung 43: Ausschnitt eines Zink-Konturplots eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms_____	101
Abbildung 44: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms_____	102
Abbildung 45: Zink-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms____	103
Abbildung 46: Ein mit H&E gefärbter invasiv lobulärer G2 Mammakarzinomschnitt_____	103
Abbildung 47: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms_____	104
Abbildung 48: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms ____	105
Abbildung 49: Ein mit H&E gefärbter invasiv lobulärer G2 Mammakarzinomschnitt_____	105
Abbildung 50: Zink-Konturplotausschnitt eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms_____	106
Abbildung 51: CCD-Kameraaufnahme eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3 _____	107
Abbildung 52: Zinkkonturplot eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3 ____	108
Abbildung 53: Ein mit H&E gefärbter eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3 _____	109
Abbildung 54: Zink-Konturplotausschnitt eines ID G3 Mammakarzinoms mit DCIS G3 _____	110
Abbildung 55: CCD-Kameraaufnahme eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms_____	111
Abbildung 56: Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms ____	111
Abbildung 57: Ein mit H&E gefärbter invasiv duktales G3 Mammakarzinoms ____	112
Abbildung 58: Ausschnitt eines Zink-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms_____	112

Abbildung 59: Bestimmung der orts aufgelöste Zinkverteilung in einem invasiv duktalen Mammakarzinom mittels μ SRXRF Analyse. H&E gefärbter Gewebeschnitt (links), Konturplot des Elements Zink (rechts, Skalierung in ppm) (Abbildung aus FARQUHARSON et al. 2008)	114
Abbildung 60: Zink-Konturplot eines invasiven duktalen Mammakarzinoms. Die Datenpunkte (schwarze Punkte) in den Rechtecken wurden für die Datenberechnung genutzt	115
Abbildung 61: Säulendiagramm der Krebszellen-korrelierten Zinkkonzentrationen	117
Abbildung 62: Säulendiagramm der Stroma-korrelierten Zinkkonzentrationen	118
Abbildung 63: Kameraaufnahmen zweier ID G1 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	123
Abbildung 64: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktalen G1 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	124
Abbildung 65: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktalen G1 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	125
Abbildung 66: Eisen-Konturplot eines invasiv duktalen G1 Mammakarzinom	126
Abbildung 67: Kameraaufnahmen zweier ID G2 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	127
Abbildung 68: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktalen G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	128
Abbildung 69: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktalen G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	129
Abbildung 70: Kameraaufnahmen zweier ID G3 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse	130

Abbildung 71: Schwefel-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse_____	130
Abbildung 72: Phosphor-Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse_____	131
Abbildung 73: Kameraaufnahmen zweier IL G2 Mammakarzinomschnitte. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse _____	132
Abbildung 74: Schwefel-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse_____	132
Abbildung 75: Phosphor-Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms. Links, die Probe der LA-ICP-MS-, rechts der Gewebeschnitt der μ -RFA Analyse_____	133
Abbildung 76: SRXRF Analyse eines invasiv duktales Mammakarzinoms. H&E gefärbter Gewebeschnitt (links oben); Eisenkonturplot (rechts oben); Kupferkonturplot (links unten); Zinkkonturplot (rechts unten) (Abbildungen aus DA SILVA et al. 2012) _____	134
Abbildung 77: Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms _____	136
Abbildung 78: Konturplots der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink eines invasiv duktales Mammakarzinoms _____	138
Abbildung 79: Berechnete Intensitätsverhältnisse zwischen Krebs- und Stromagewebe_____	141
Abbildung 80: Intensitätsvergleich von Mammakarzinomsubtypen der Elemente C, P, S, Fe und Cu_____	145
Abbildung 81: Vergleich des Zn-Flächenintegrals, des Östrogen-, Progesteron- und Ki-67 Status der unterschiedlichen Mammakarzinomsubtypen _____	147

Abbildung 82: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 125 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 50 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm _____	182
Abbildung 83: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 125 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 50 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm _____	183
Abbildung 84: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 100 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm _____	183
Abbildung 85: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 100 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm _____	184
Abbildung 86: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 50 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,05 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm _____	184
Abbildung 87: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 µm; Ablationsgeschwindigkeit: 50 µm/s; Messzeit pro m/Z: 0,05 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm _____	185
Abbildung 88: ¹³ C-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms ____	186
Abbildung 89: ⁵⁷ Fe-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms ____	187
Abbildung 90: ⁶³ Cu-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms ____	188
Abbildung 91: ¹³ C-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms ____	189
Abbildung 92: ⁵⁷ Fe-Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms ____	190

Abbildung 93: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	190
Abbildung 94: ^{13}C -Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	191
Abbildung 95: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms	192
Abbildung 96: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms	192
Abbildung 97: ^{64}Zn -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	193
Abbildung 98: ^{13}C -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	194
Abbildung 99: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	194
Abbildung 100: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms	195
Abbildung 101: Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink	196
Abbildung 102: Streudiagrammanalyse eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink	196
Abbildung 103: Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink	197

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bemessungsgrundlage für das histochemische Grading nach Elston und Ellis. _____	17
Tabelle 2: Statistik von Zinkkonzentration in Brustgewebe [SILVA et al. 2008] _____	21
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Gase _____	51
Tabelle 4: Verwendete Labor-, Analysengeräte und Zubehör _____	52
Tabelle 5: Laserparameter zur Einstellung der maximalen Sensitivität _____	55
Tabelle 6: Verwendete Isotopen im CRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren _____	56
Tabelle 7: Druckermuster zur Methodenoptimierung der LA-ICP-MS _____	58
Tabelle 8: Parameter zur Methodenoptimierung des LA-ICP-MS _____	59
Tabelle 9: LA-ICP-MS Messparameter zur Methodenoptimierung _____	61
Tabelle 10: Herstellung der Kalibrationsstandards _____	63
Tabelle 11: Parameter des Kryomikrotoms zur Herstellung von Gel- und Gewebeschnitten _____	64
Tabelle 12: LA-ICP-MS Messparameter zur Elementquantifizierung _____	65
Tabelle 13: LA-ICP-MS Parameter zur Analyse von Mammakarzinomschnitten _____	67
Tabelle 14: Messparameter der orts aufgelösten Röntgenfluoreszenzanalyse _____	71
Tabelle 15: Berechnung der Faktoren zum Intensitätsvergleich _____	82
Tabelle 16: Detektierte Zink Intensitäten der matrixangepassten Kalibrationsstandards _____	87
Tabelle 17: Bestimmung der relativen Häufigkeit aus den LA-ICP-MS Messwerten _____	88
Tabelle 18: Konzentrationsvergleich der Mammakarzinomsubtypen _____	116
Tabelle 19: Literaturvergleich der ermittelten Zinkkonzentrationen in Krebs- und Stromagewebe _____	120

Tabelle 20: Bestimmtheitsmaß R^2 der Streudiagrammanalysen zwischen den Elementen Phosphor, Schwefel und Zink _____	137
Tabelle 21: Berechnete Intensitätsverhältnisse zwischen Krebszellgewebe und Stroma für die Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer. _____	139
Tabelle 22: Literaturvergleich der ermittelten Eisen-Konzentrationen in Krebs- und Stromagewebe _____	142
Tabelle 23: Literaturvergleich der ermittelten Kupfer-Konzentrationen in Krebs- und Stromagewebe _____	144
Tabelle 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von HER-2, MT, Ki-67 und dem integrierten Flächensignal des Elements Zink. An den freien Stellen wurde keine MT Messung durchgeführt _____	148
Tabelle 25: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G1 Karzinoms _____	198
Tabelle 26: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G2 Karzinoms _____	199
Tabelle 27: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G2 Karzinoms _____	199
Tabelle 28: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines IL G2 Karzinoms _____	200
Tabelle 29: Korrelation zwischen den Östrogen- und Progesteronrezeptoren und der Zinkkonzentration _____	201

10. Anhang

10.1 Intensitätsvergleich der Druckerproben zur Methodenoptimierung

Im Folgenden sind die Spektren der Linienablationen zur Bestimmung der maximalen Kupferintensität abgebildet. Aus den ermittelten Werten wurde der Abbildungsfaktor IF berechnet. Mit einem IF von eins wird gezeigt, dass für Bereiche mit identischer Elementkonzentration bei einer ICP-MS Analyse identischen Signalintensitäten detektiert werden.

In den Spektren sind die Ergebnisse der Linienablation zweier Kreise (Durchmesser: 0,05 cm und 0,2 cm) des Ablationsmusters abgebildet. Die Messparameter variieren beim Laserstrahldurchmesser, der Ablationsgeschwindigkeit und der Messzeit pro m/Z Verhältnis.

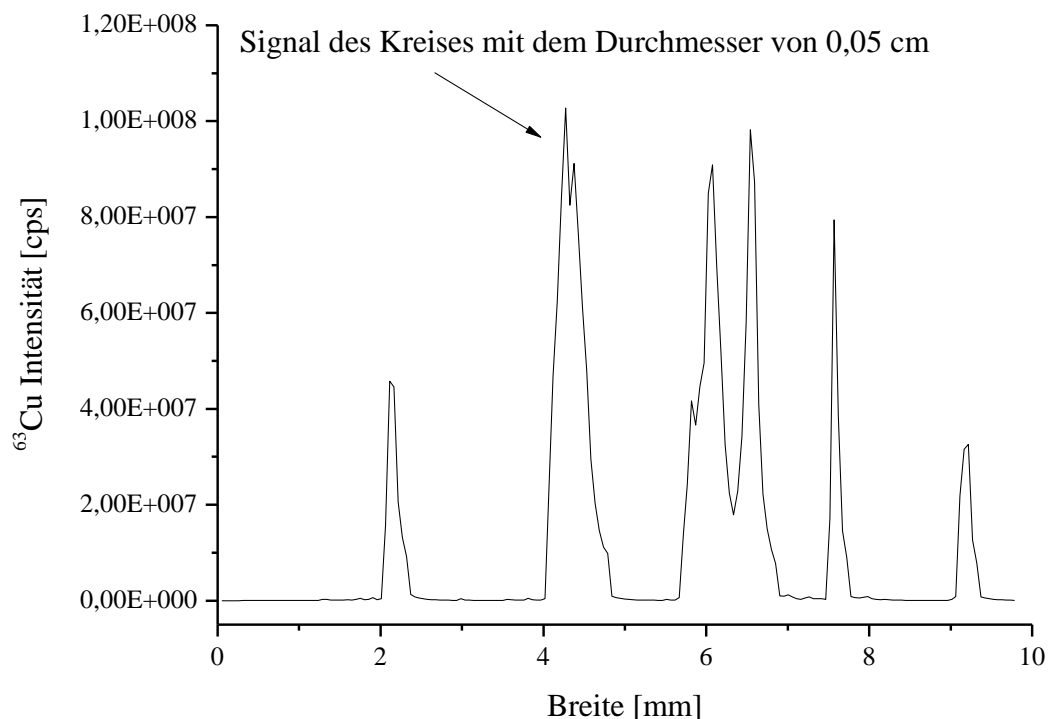


Abbildung 82: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 125 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 50 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm

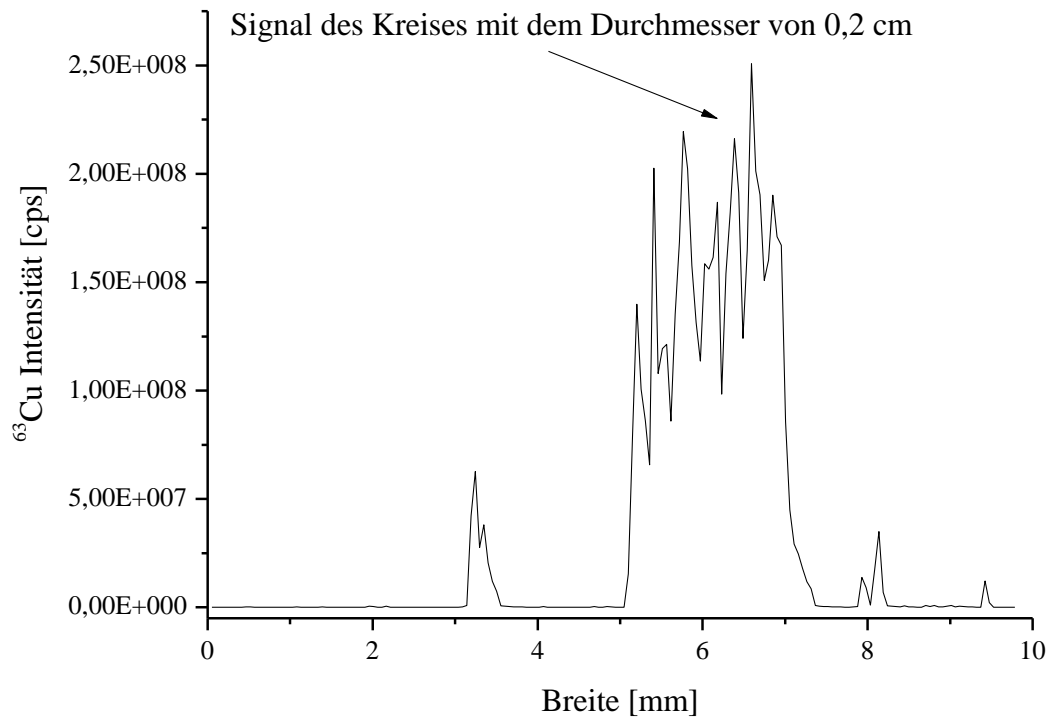


Abbildung 83: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 125 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 50 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm

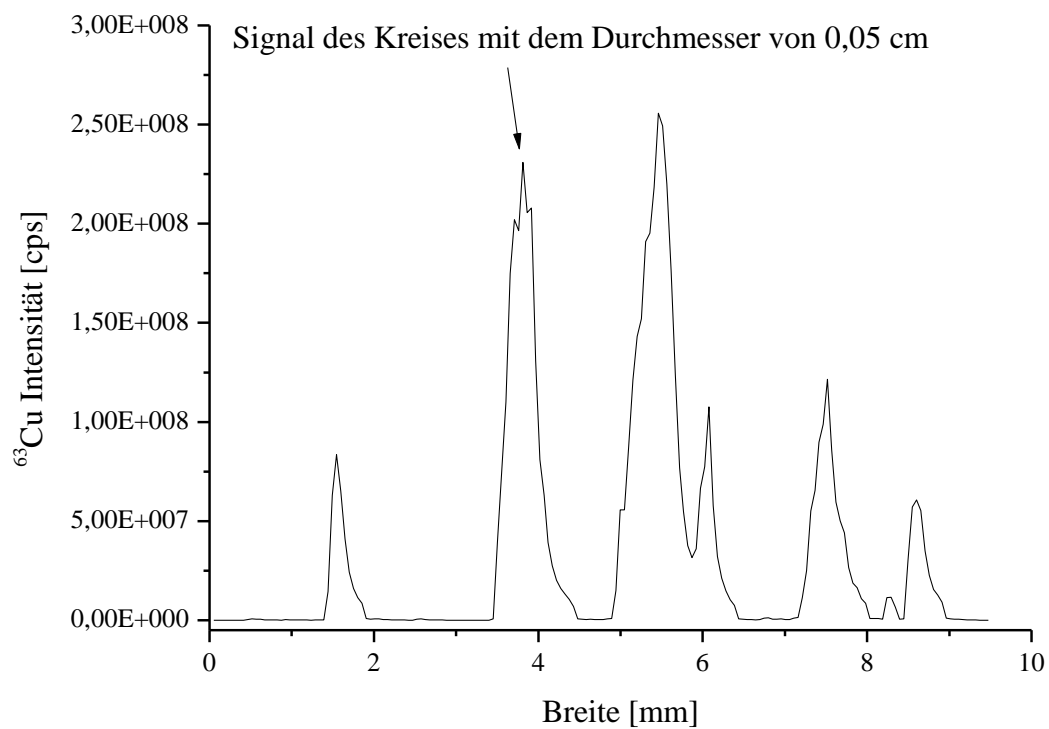


Abbildung 84: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 100 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm

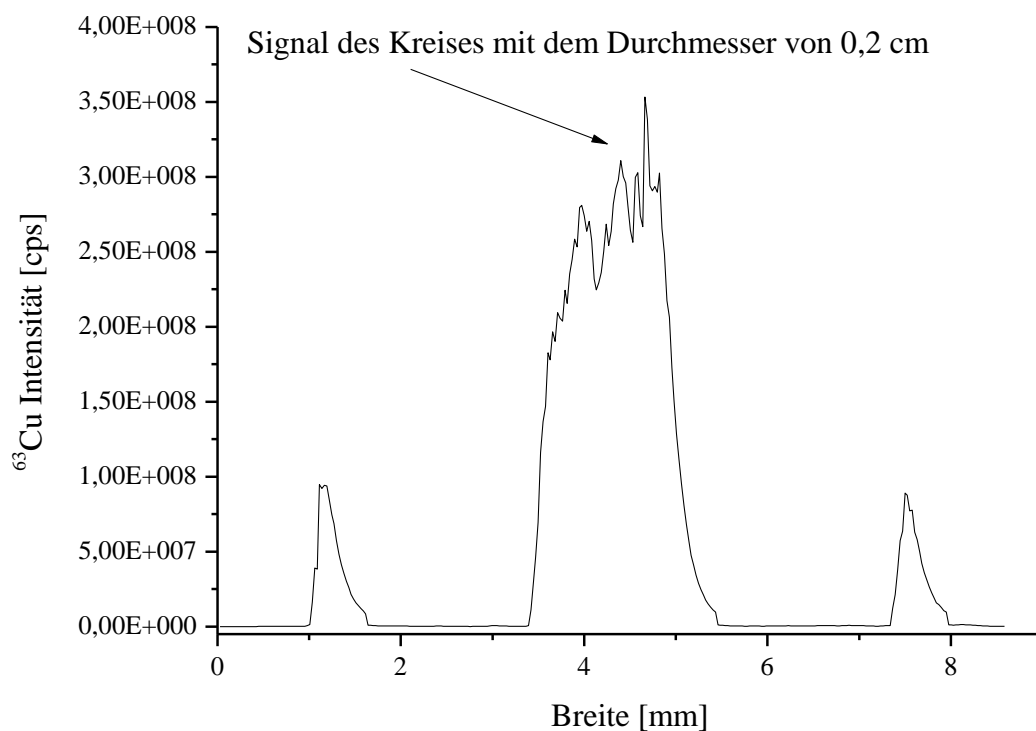


Abbildung 85: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 100 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,1 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm

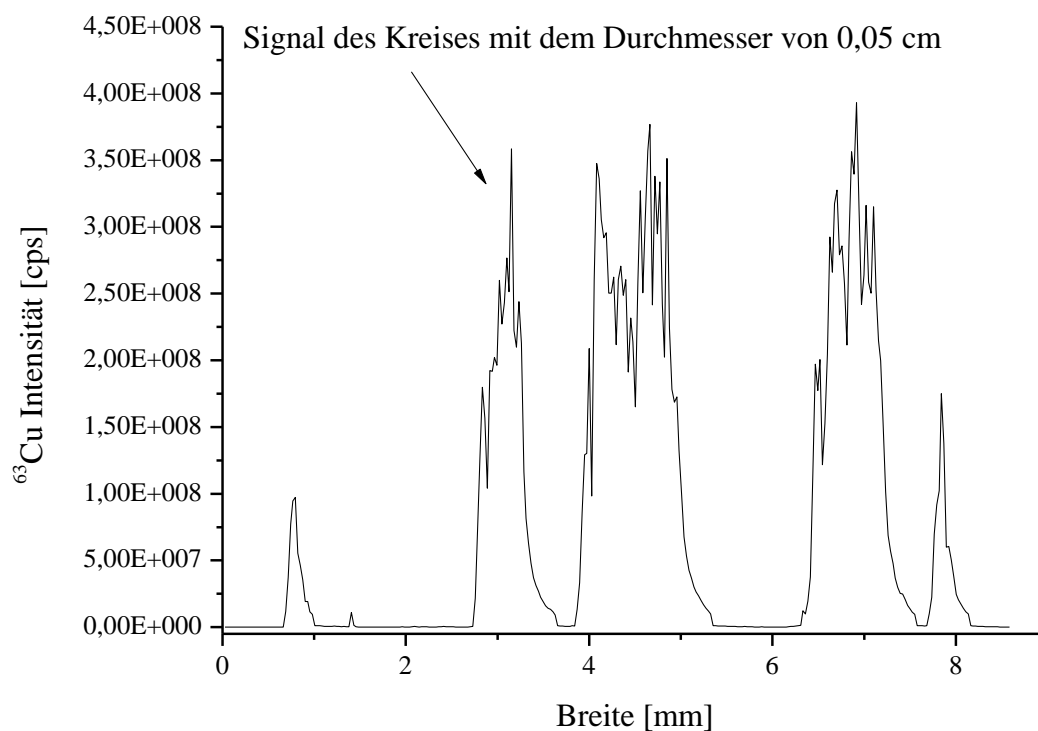


Abbildung 86: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 50 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,05 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,05 cm

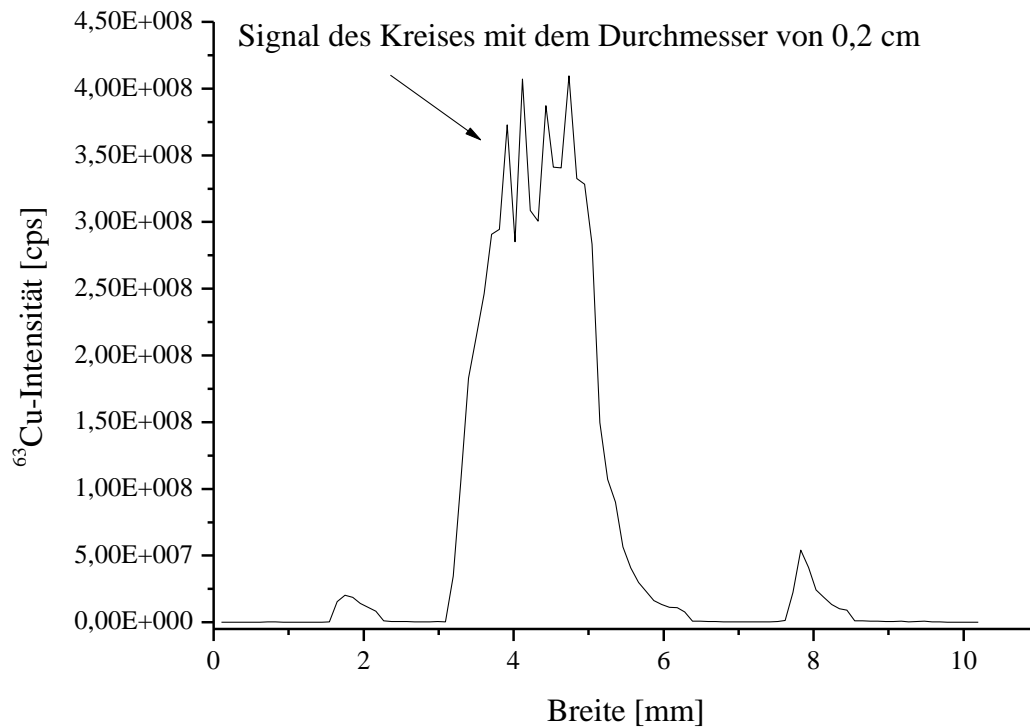


Abbildung 87: Linienablation zur Bestimmung der maximalen Signalintensität bei folgenden Messparametern: Laserstrahldurchmesser: 200 μm ; Ablationsgeschwindigkeit: 50 $\mu\text{m/s}$; Messzeit pro m/Z: 0,05 s. Der Durchmesser des Kreises beträgt 0,2 cm

10.2 Elementkonturplots der Mammakarzinomsubtypen

Neben der Quantifizierung des Elements Zink wurden die Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer qualitativ bestimmt. Im Folgenden sind die Konturplots von Kohlenstoff, Eisen und Kupfer abgebildet.

10.2.1 Elementkonturplots des invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

Die stark erhöhte Kohlenstoffintensität in Bereich 2 (Abbildung 88) resultiert aus der Ablation des Einbettmediums. Eine Bestätigung hierfür ergibt sich aus dem Ergebnis der Messungen von Phosphor (Abbildung 65 ,S.125), Schwefel (Abbildung 64, S.124) oder Zink (Abbildung 34, S.92). Alle drei Elemente konnten in diesem Bereich nicht detektiert werden. Im Bereich eins wurden mittels immunhistologischer Analyse keine Krebszellen detektiert.

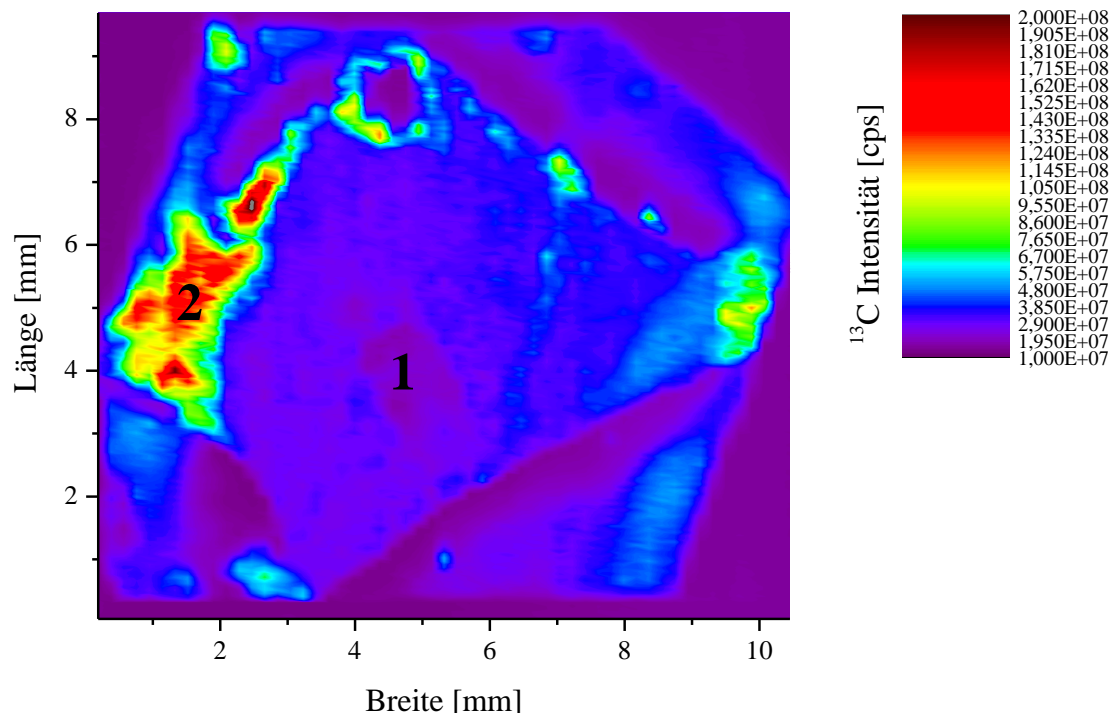


Abbildung 88: ^{13}C -Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

Der Eisenkonturplot (Abbildung 89) zeigt eine Intensitätserhöhung in dem Stromabereich. Beim invasiv duktales G3 Mammakarzinom (Abbildung 95, S.192) ist im Konturplot derselbe Effekt zu sehen. Zu einem gleichen Ergebnis

kam Farquharson [FARQUHARSON *et al.* 2008] bei einer SRXRF Analyse eines Mammakarzinoms. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass bei der Korrelation zum H&E gefärbten Gewebeschnitt ein eindeutig krebszellenfreier Bereich zugeordnet werden konnte.

Es ist jedoch zu erwähnen, dass dieses Ergebnis noch intensivere Untersuchung bedarf, da dieses Phänomen, auch bei Karzinomen desselben Gradingfaktors nicht immer nachzuweisen war.

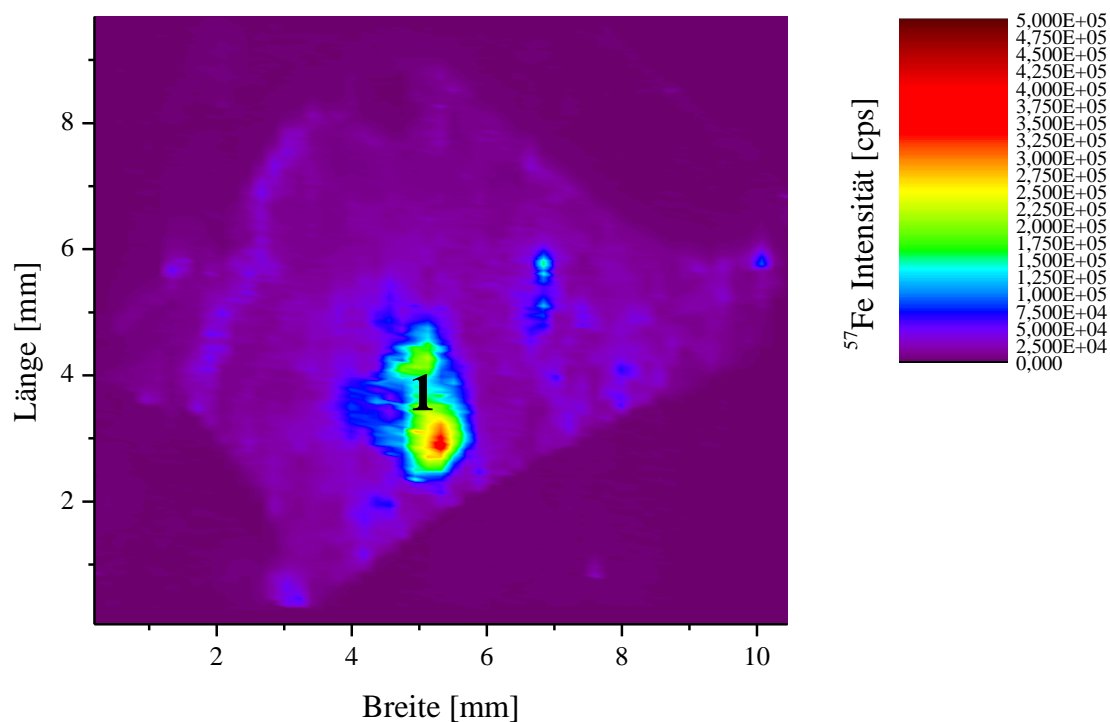


Abbildung 89: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

Die erhöhte Kupferkonzentration der Radbereiche des Gewebes in Abbildung 90 ist auf die Probenvorbereitung zurückzuführen. Dieser Effekt war durchgängig bei den Gewebeproben zu detektieren.

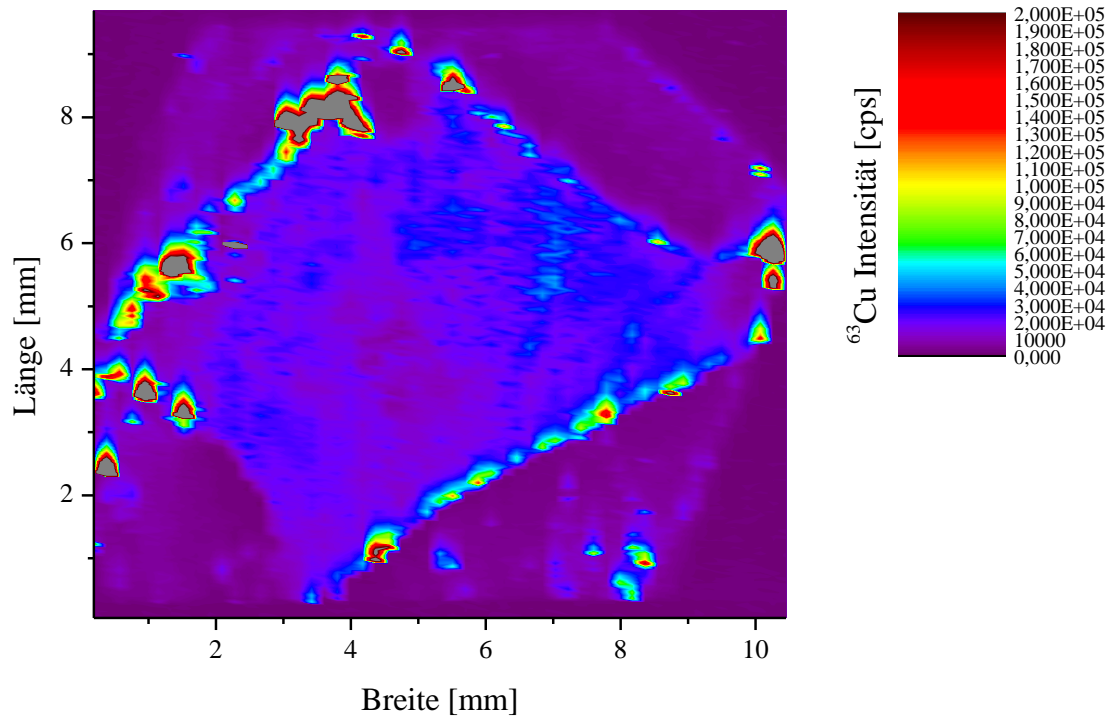


Abbildung 90: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

10.2.2 Elementkonturplots des invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

Die Konturplots des invasiv duktales G2 Mammakarzinoms zeigen für die Elemente Kohlenstoff und Kupfer identische Phänomene wie das ID G1 Karzinom (Kapitel 10.2.1, S.186).

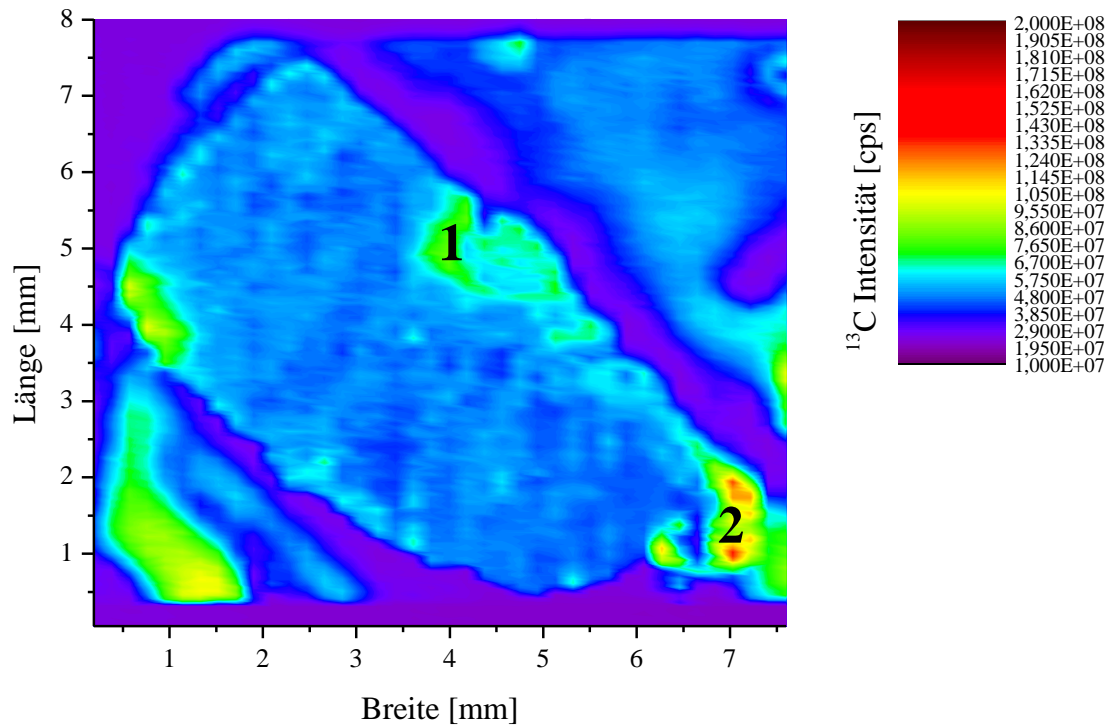


Abbildung 91: ^{13}C -Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

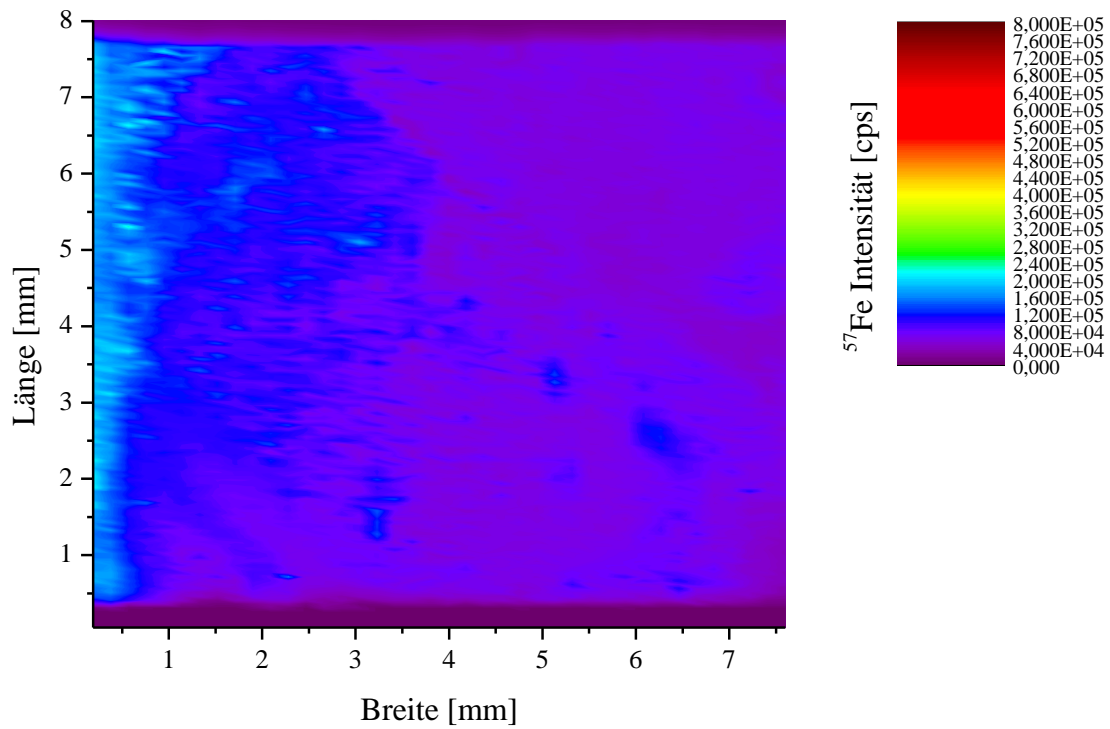


Abbildung 92: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv duktales G1 Mammakarzinoms

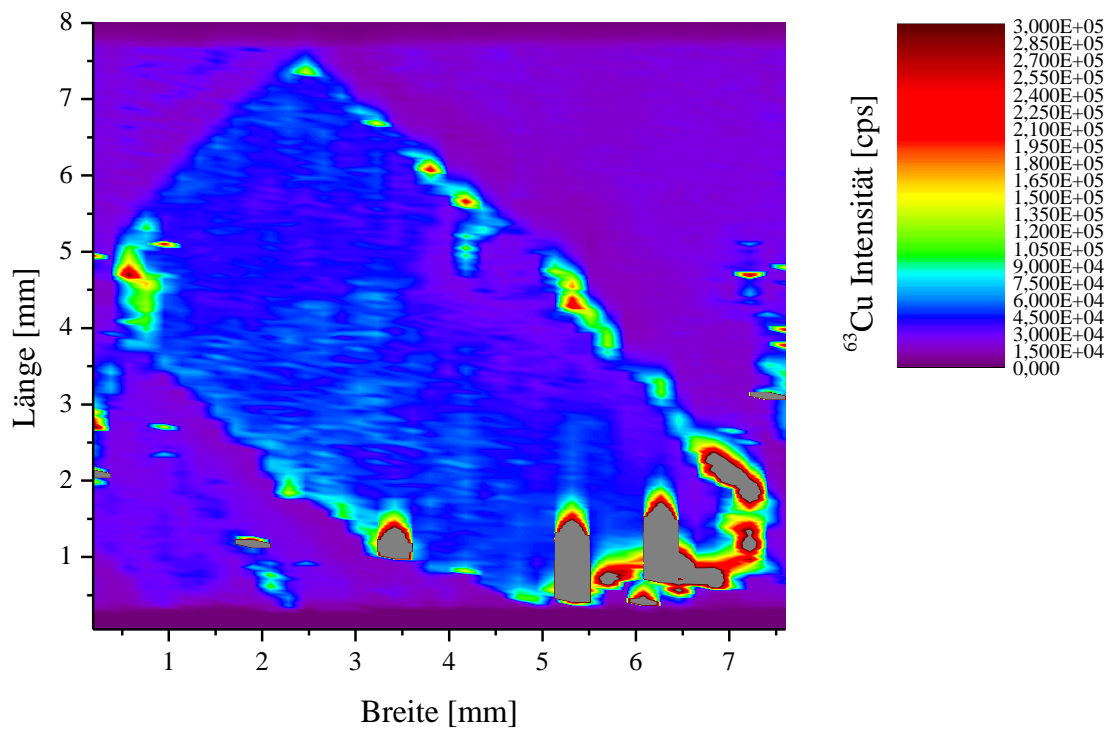


Abbildung 93: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

10.2.3 Elementkonturplots des invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

Die Konturplots des invasiv duktales G3 Mammakarzinoms zeigen für die Elemente Kohlenstoff und Kupfer identische Phänomene wie das ID G1 und das ID G2 Karzinom. Außerdem konnte bei dieser Probe wieder gezeigt werden, dass in den krebszellfreien Bereichen eine niedrigere Eisenintensität detektiert wurde.

Des Weiteren konnte an den Randbereichen der Gewebeprobe wieder eine erhöhte Kupferintensität ermittelt werden.

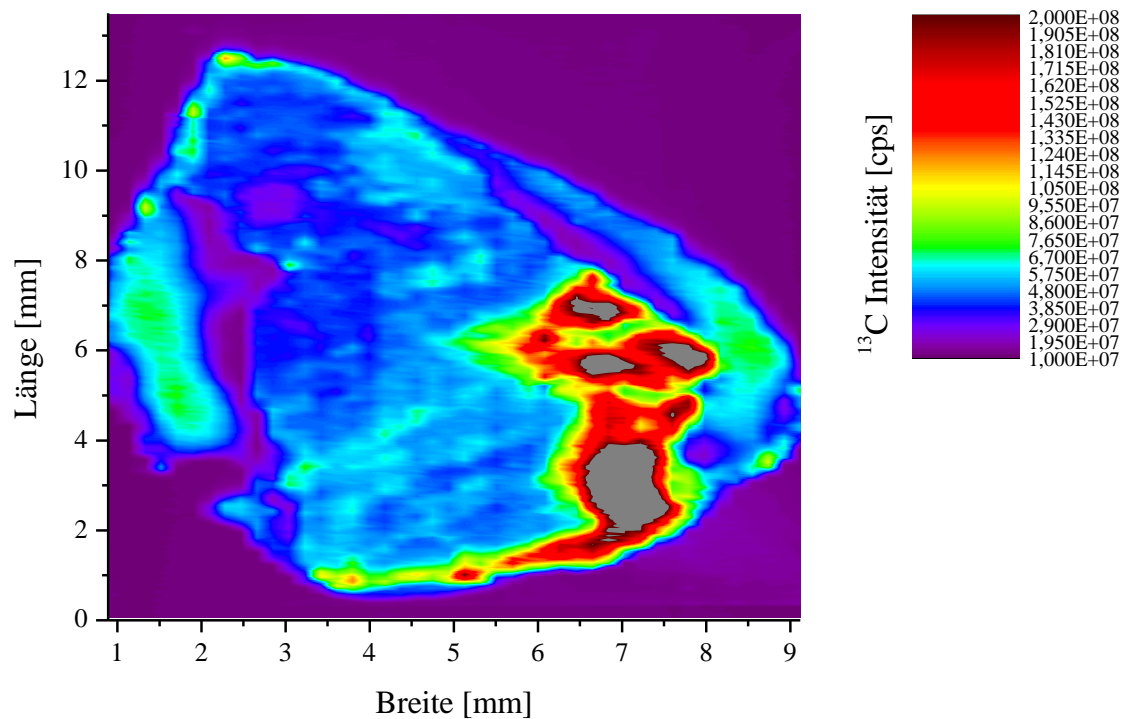


Abbildung 94: ^{13}C -Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

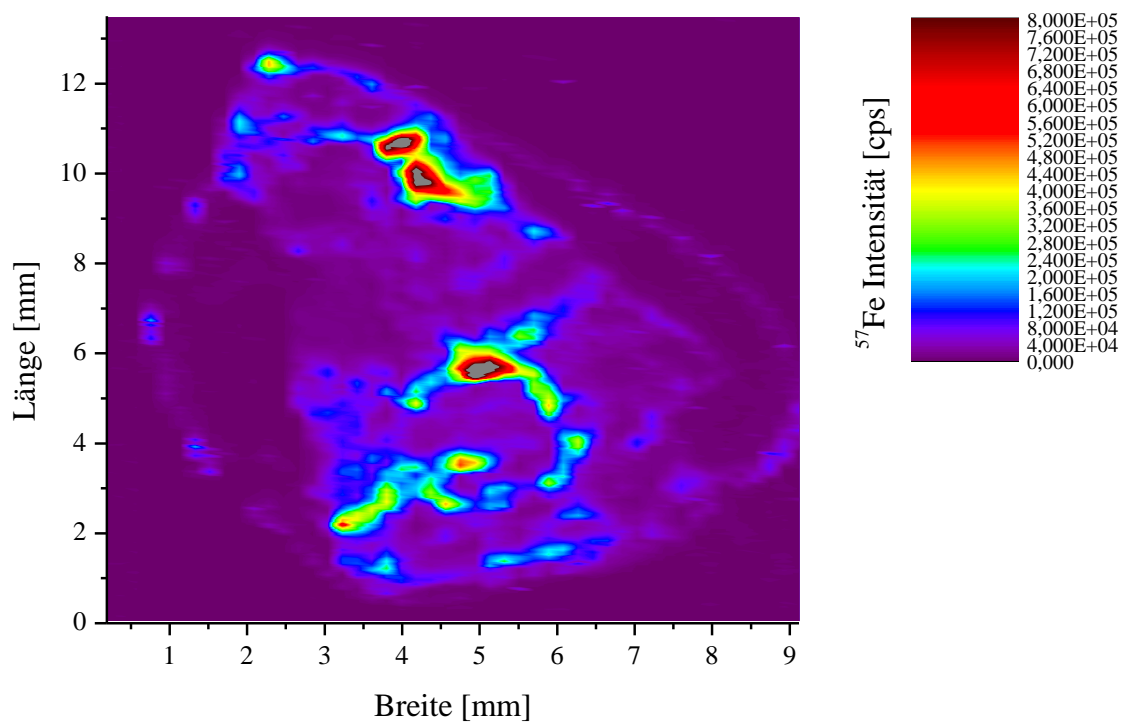


Abbildung 95: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

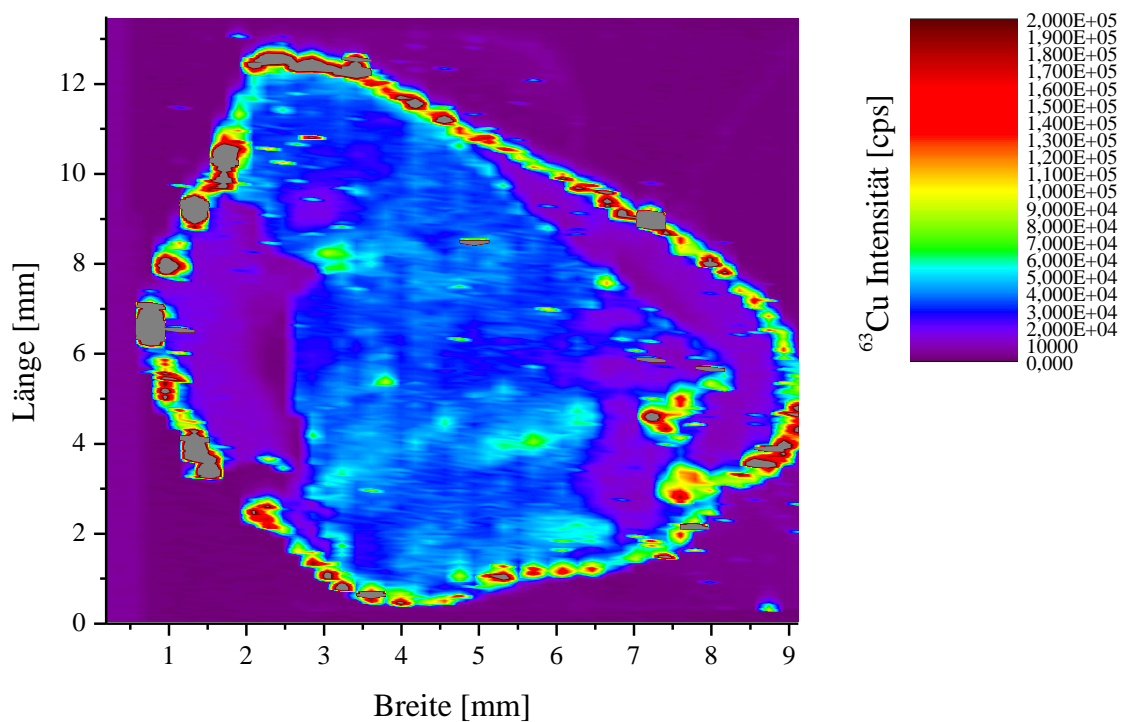


Abbildung 96: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms

10.2.4 Elementkonturplots des invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

Die Konturplots des invasiv lobulären G2 Mammakarzioms zeigen für das Element Kohlenstoff ein identisches Phänomen wie bei den ID G1, ID G2 und ID G3 Karzinomen. Beim Element Zink konnte eine Korrelation zu den H&E gefärbten Krebszellen aufgezeigt werden.

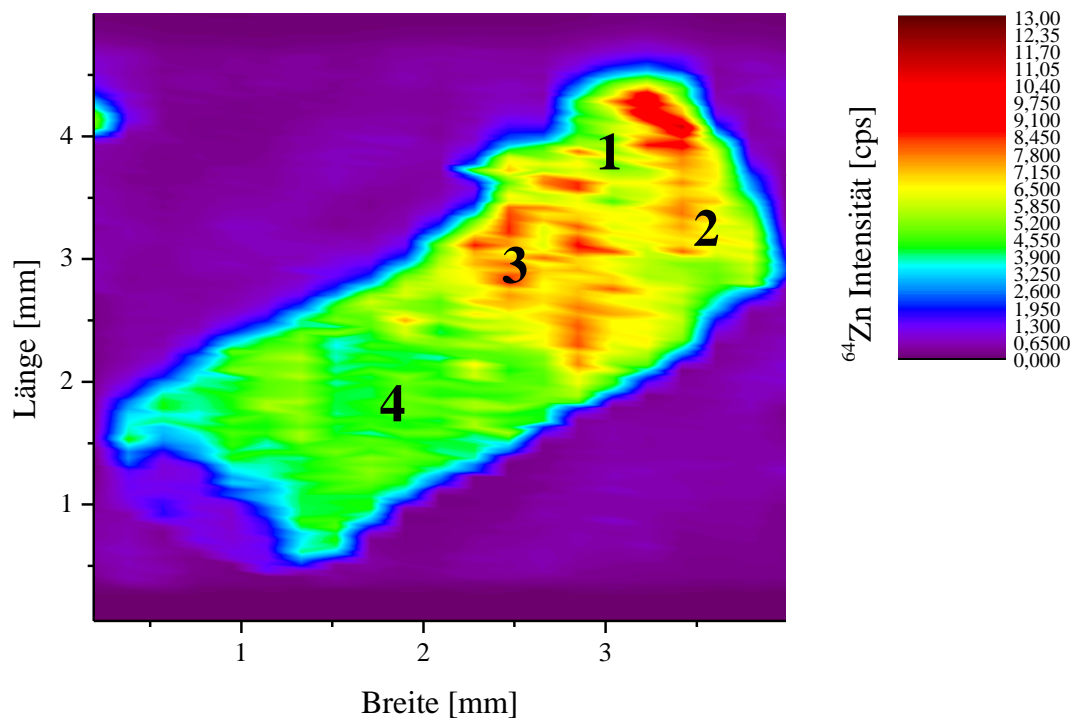


Abbildung 97: ^{64}Zn -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

Jedoch wurde bei diesem Gewebeschnitt am Rand der Probe keine Intensitätszunahme von Kupfer detektiert.

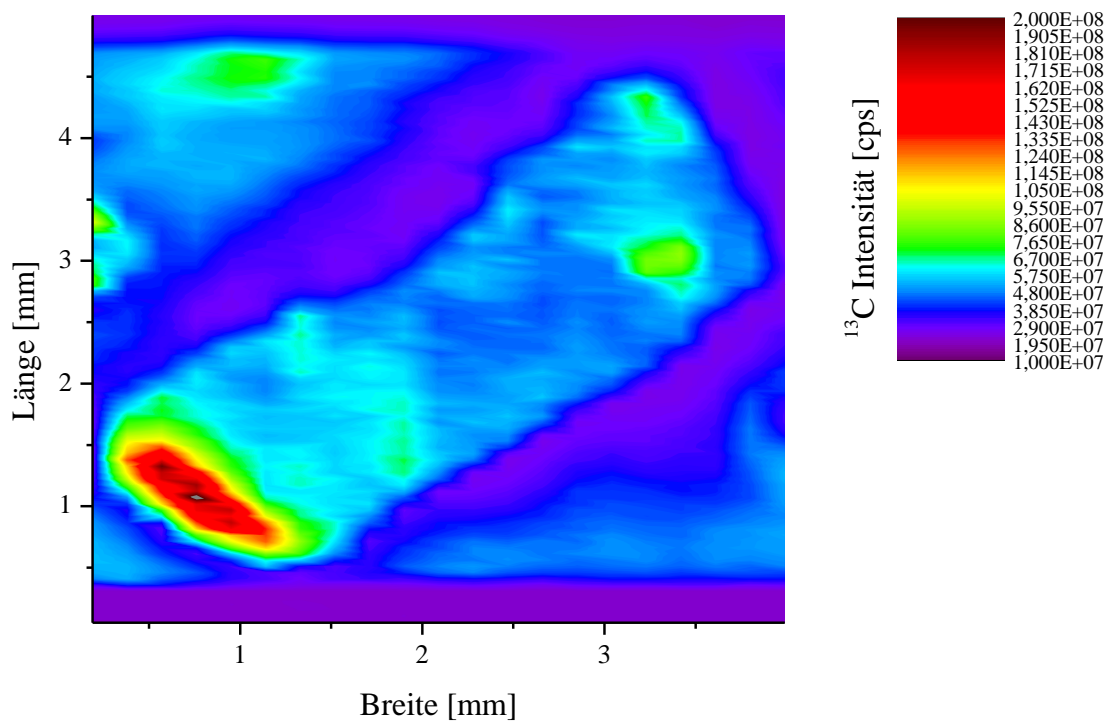


Abbildung 98: ^{13}C -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

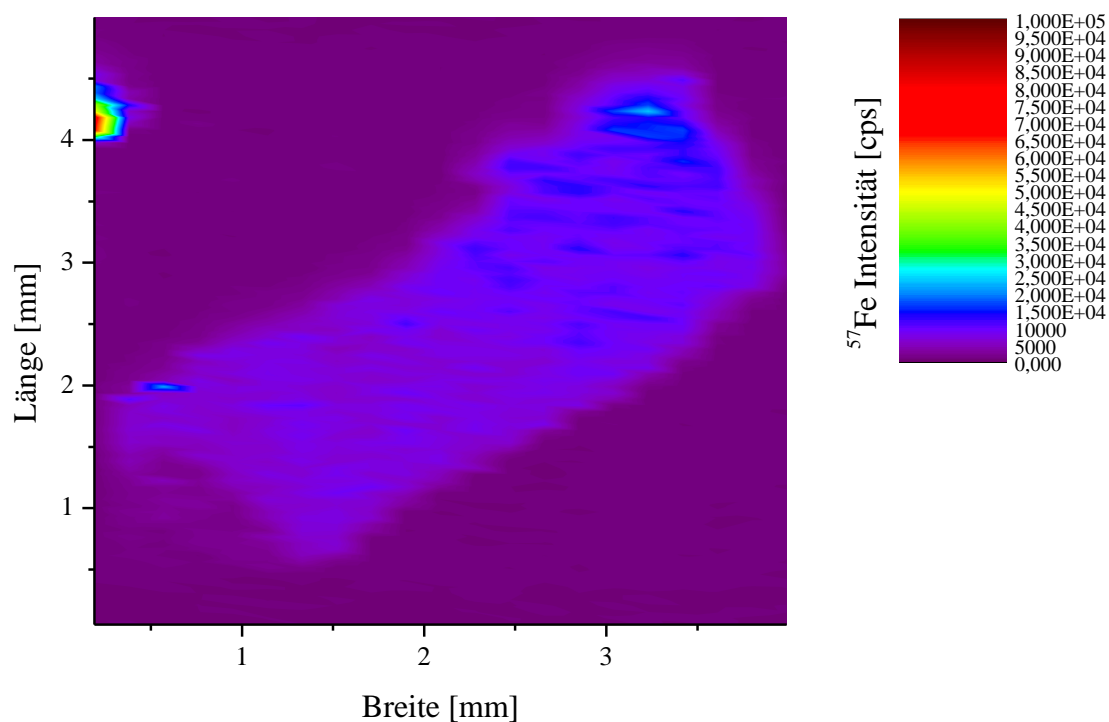


Abbildung 99: ^{57}Fe -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

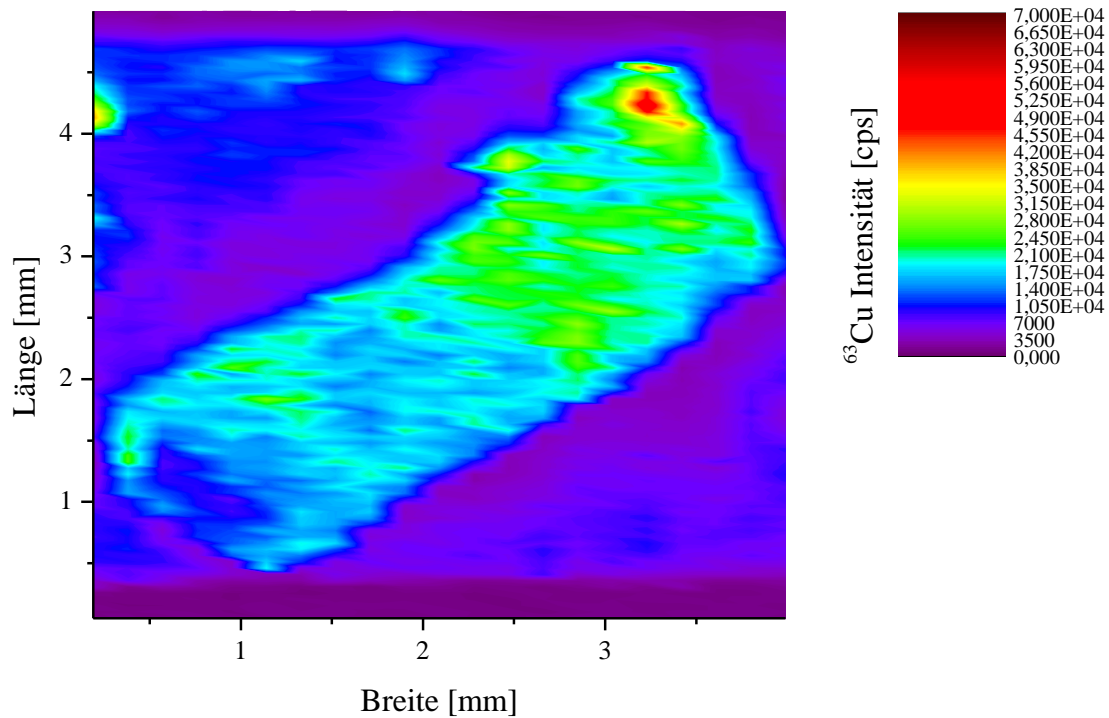
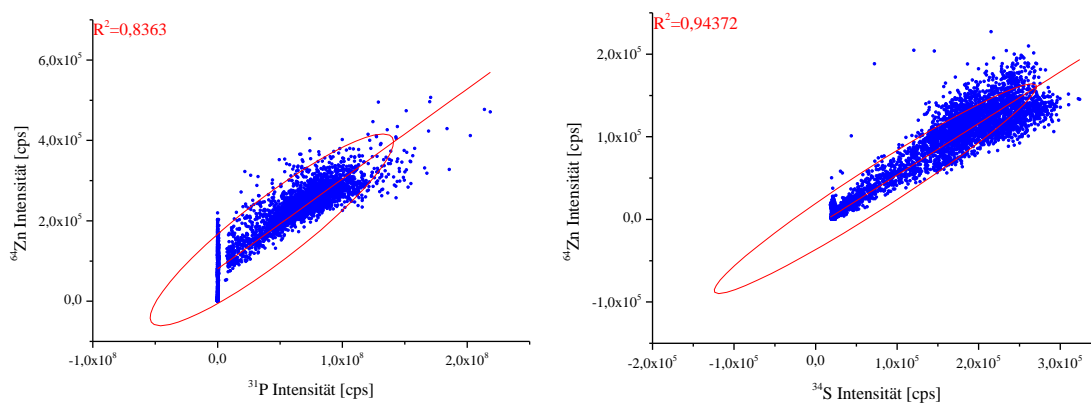


Abbildung 100: ^{63}Cu -Konturplot eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

10.3 Streudiagrammanalyse der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink

Im Folgenden sind die Streudiagramme der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink abgebildete. Die statistische Zusammenfassung ist Tabelle 20 (S.137) zu entnehmen.

10.3.1 Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms



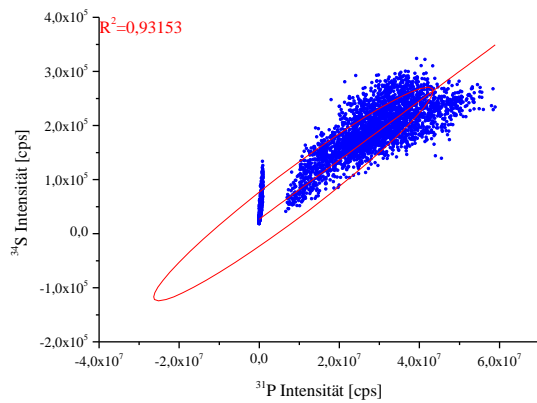


Abbildung 101: Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G2 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink

10.3.2 Streudiagrammanalyse eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms

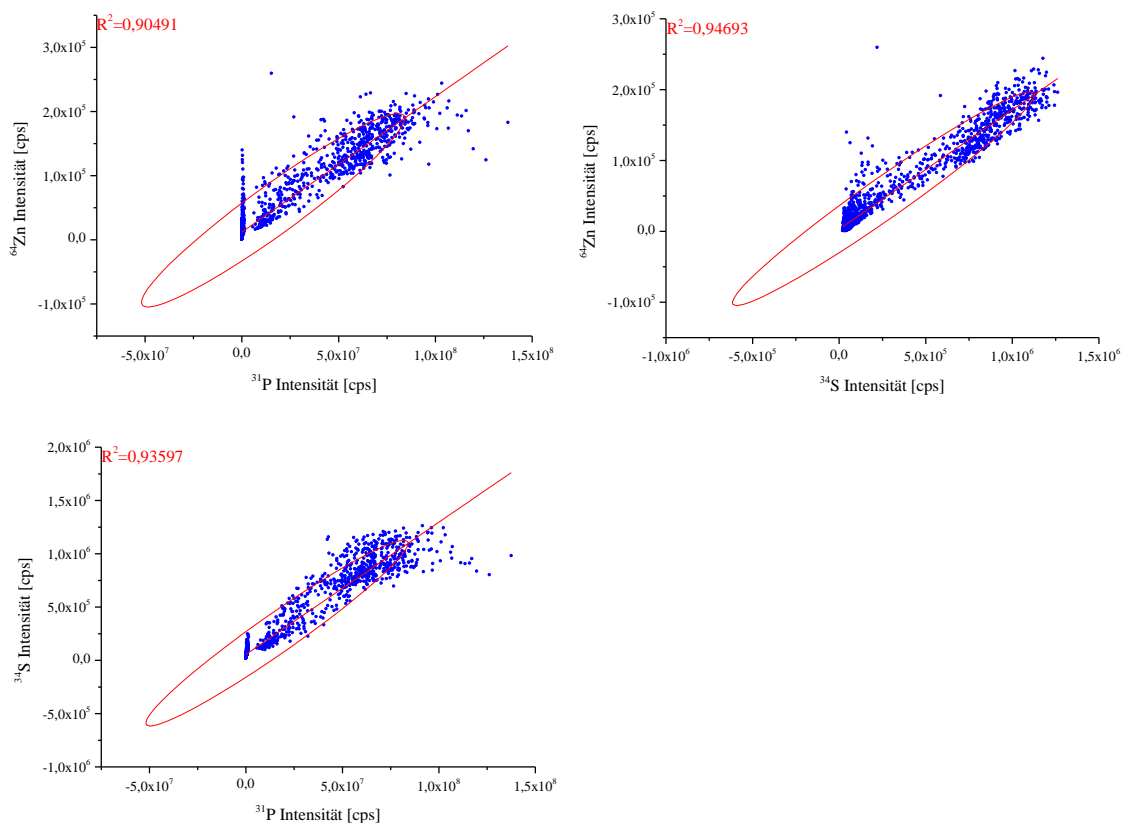


Abbildung 102: Streudiagrammanalyse eines invasiv lobulären G2 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink

10.3.3 Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms

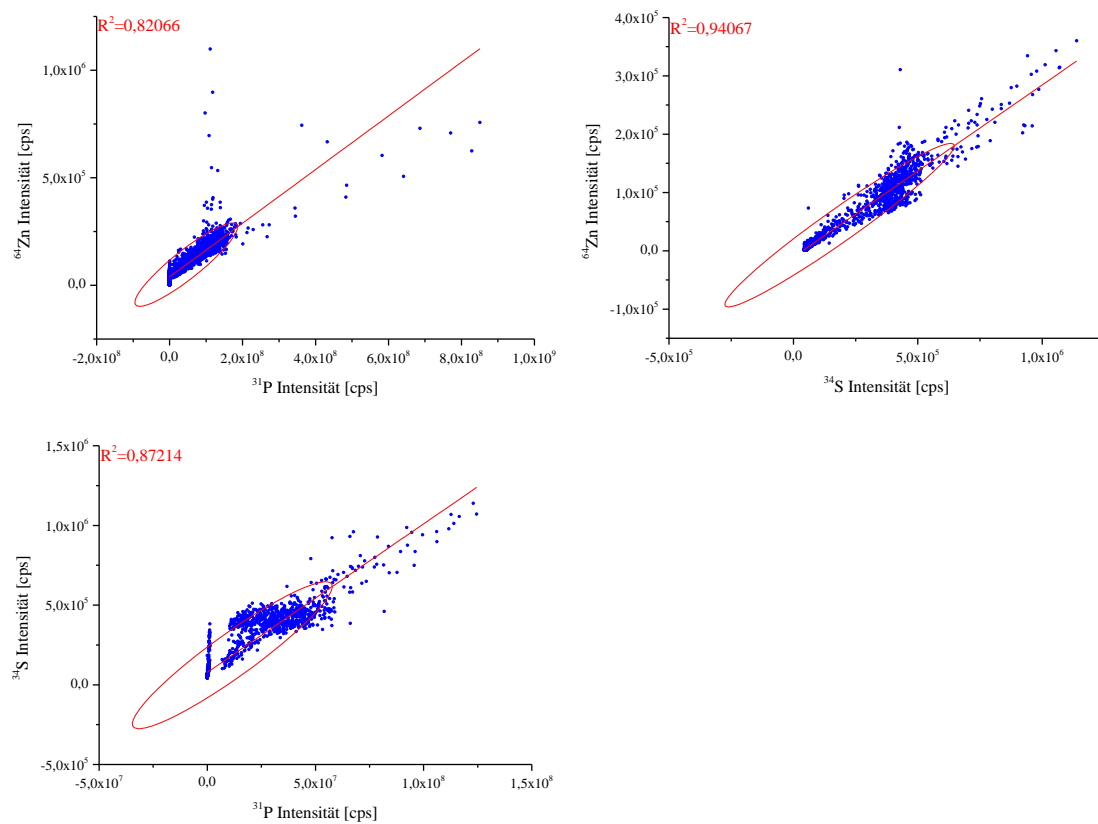


Abbildung 103: Streudiagrammanalyse eines invasiv duktales G3 Mammakarzinoms der Elemente Phosphor, Schwefel und Zink

10.4 Intensitätsvergleich zwischen Krebs- und Stromagewebebereichen der Elemente Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer

Aufgrund der Multielementfähigkeit des ICP-MS wurde neben dem Element Zink auch Kohlenstoff, Phosphor, Schwefel, Eisen und Kupfer bestimmt. Mittels der in Kapitel 4.3.2 (S.113) beschriebenen Korrelationsanalyse zwischen dem Element Zink und den H&E gefärbten Mammakarzinomschnitten konnte ebenfalls eine Differenzierung der aufgelisteten Elemente durchgeführt werden. Nachfolgend sind die gemessenen Elementsignale hinsichtlich ihres Karzinomsubtypen zusammengefasst.

Tabelle 25: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G1 Karzinoms

Invasiv duktales G1 Mammakarzinom						
	Krebszellen			Stroma		
Isotop	Mittelwert	Stabw.	Variationskoeffizient	Mittelwert	Stabw.	Variationskoeffizient
¹³C	4,11E+07	3,59E+06	0,09	2,71E+07	7,37E+05	0,03
³¹P	7,74E+07	1,79E+07	0,23	3,64E+07	2,13E+06	0,06
³⁴S	9,78E+05	8,56E+04	0,09	6,28E+05	3,51E+04	0,06
⁵⁷Fe	2,61E+04	1,07E+04	0,41	2,39E+04	5,49E+03	0,23
⁶³Cu	3,43E+04	4,81E+03	0,14	1,83E+04	1,07E+03	0,06

Tabelle 26: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G2 Karzinoms

Invasiv duktales G2 Mammakarzinom						
	Krebszellen			Stroma		
Isotop	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient
¹³ C	8,38E+07	2,19E+07	0,26	4,37E+07	1,81E+06	0,04
³¹ P	5,18E+07	1,98E+07	0,38	4,28E+07	3,78E+06	0,09
³⁴ S	1,07E+07	2,11E+06	0,20	8,39E+05	9,01E+04	0,11
⁵⁷ Fe	3,46E+05	5,48E+04	0,16	1,73E+05	3,21E+04	0,19
⁶³ Cu	9,97E+04	2,35E+04	0,24	3,46E+04	2,71E+03	0,08

Tabelle 27: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines ID G2 Karzinoms

Invasiv duktales G3 Mammakarzinom						
	Krebszellen			Stroma		
Isotop	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient
¹³ C	5,72E+07	3,02E+06	0,05	4,09E+07	6,27E+06	0,15
³¹ P	1,78E+08	1,49E+07	0,08	8,86E+07	1,77E+07	0,20
³⁴ S	1,24E+07	7,87E+05	0,06	9,81E+05	1,55E+05	0,16
⁵⁷ Fe	1,08E+05	3,52E+04	0,33	2,32E+04	3,15E+03	0,14
⁶³ Cu	4,20E+04	2,34E+03	0,06	3,70E+04	5,24E+03	0,14

Tabelle 28: Elementintensitäten der Krebszellen und des Stroma eines IL G2 Karzinoms

Invasiv lobuläres G2 Mammakarzinom						
	Krebszellen			Stroma		
Isotop	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient	Mittelwert	Stabw.	Variations- koeffizient
¹³C	4,76E+07	1,36E+06	0,03	4,61E+07	1,22E+06	0,03
³¹P	7,72E+07	6,93E+06	0,09	5,66E+07	7,65E+06	0,14
³⁴S	8,78E+05	3,47E+04	0,04	7,31E+05	3,43E+04	0,05
⁵⁷Fe	1,26E+04	1,48E+03	0,12	1,06E+04	1,50E+03	0,09
⁶³Cu	2,38E+04	2,58E+03	0,11	2,33E+04	2,01E+03	0,08

10.5 Korrelation zwischen den Tumormarkern und der Zinkkonzentration

Neben der Bestimmung des Gradingfaktors, wurden von Prof. Dr. Bankfalvi weitere prognostische Faktoren ermittelt. In Tabelle 29 sind die Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie das integrierte Flächensignal des Elements Zink aufgelistet.

Tabelle 29: Korrelation zwischen den Östrogen- und Progesteronrezeptoren und der Zinkkonzentration

Diagnose	Östrogenrezeptor [%]	Progesteronrezeptor [%]	Integriertes Flächensignal von Zink
ID G1	90	90	1,69E+07
ID G1	90	10	2,41E+07
ID G1	90	90	1,75E+07
IL G2	100	100	6,61E+06
IL G2	95	95	4,61E+06
ID G2	99	99	2,14E+07
ID G2	100	100	2,08E+07
ID G2	5	100	2,45E+07
ID G3	60	negativ	2,28E+07
ID G3	negativ	negativ	1,46E+07
ID G3	95	25	1,65E+07
ID G3	10	30	1,78E+07
ID G3	neg.	neg.	2,26E+07
ID G3	95	90	1,77E+07

11. Publikationsliste

Poster und Vorträge

Riesop D, Bankfalvi A, Buldirsky M, Hirner AV, (2013), Zinc distribution in human breast carcinomas measured by LA-ICP-MS, Poster: Anakon 2013, 04.-07. März in Essen

Riesop D, Buldirsky M, Hirner AV, (2011), Der Einsatz der CN-PAGE zur Speziierung von Metallproteinen, Poster: Anakon 2011, 22.-25. März in Zürich, Schweiz

Riesop D, Hirner AV, (2009), Ortsaufgelöste Analyse und Elementspeziierung mittels massenspektrometrischer Methoden am Beispiel des Zinks in Gewebe, Vortrag: Kolloquium des Instituts für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen, 26. November in Essen

Riesop D, Hollmann M, Hirner AV, (2009), Interaction of bismuth cysteine complexes with plasma proteins, Poster: Internationales JCF-Spring Symposium, 11.-13. März in Essen

Hollmann M, Hippler J, Riesop D, Hirner AV, (2009) Investigation of Bismuth-Metabolism by Mass Spectrometry, Vortrag: Internationales JCF-Spring Symposium, 11.-13. März in Essen.

11.1 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11.2 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Untersuchungen zur orts aufgelösten Zinkverteilung in
Mammakarzinomen und der Korrelation zum Tumortyp und zu
histologischen Prognosefaktoren“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Juni 2013

(David Riesop)

11.3 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.